

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKDENİZ BÖLGESİNDE BULUNAN LAGÜNLERDEKİ  
(AKYATAN, AKGÖL-PARADENİZ VE BEYMELEK) LEVREK  
(*Dicentrarchus labrax*), ÇİPURA (*Sparus aurata*) VE BAZI KEFAL  
TÜRLERİNDE (*Mugil spp.*) VİRAL NERVÖZ NEKROZİS (VNN)  
VİRUSUNUN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**Ufuk OĞUZ**

**DOKTORA TEZİ**

Veterinerlik Virolojisi Anabilim Dalı

**Danışman**  
**Prof. Dr. Sibel YAVRU**

**KONYA-2024**

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKDENİZ BÖLGESİNDE BULUNAN LAGÜNLERDEKİ  
(AKYATAN, AKGÖL-PARADENİZ ve BEYMELEK) LEVREK  
(*Dicentrarchus labrax*), ÇİPURA (*Sparus aurata*) ve BAZI KEFAL  
TÜRLERİNDE (*Mugil spp.*) VİRAL NERVÖZ NEKROZİS (VNN)  
VİRUSUNUN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**Ufuk OĞUZ**

**DOKTORA TEZİ**

Veterinerlik Virolojisi Ana Bilim Dalı

**Danışman**  
**Prof. Dr. Sibel YAVRU**

Bu tez, Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından TAGEM/HSGYAD/A/21A5/P4/2627 proje numarası ile desteklenmiştir.

**KONYA-2024**

## ÖNSÖZ

Gelişen dünyada sağlıklı gıdaya erişim giderek daha da zor hale gelmektedir. Ayrıca yakın gelecekte gıda kıtlığı ile karşı karşıya kalacağımız düşünülürse hayvansal ürünlerin üretimi daha da önem kazanacaktır. İnsan sağlığı açısından tüm hayvansal ürünler değerli bir protein kaynağıdır. Bu nedenle zengin protein içeriği ile temel besin maddelerini içinde barındıran ve çoklu doymamış yağ asitleri açısından en önemli hayvansal gıda kaynağı olan balıkların önemi ortadadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO)'nın 2022 yılında yayımlanan raporunda, su ürünleri sektörünün çok hızlı bir gelişim gösterdiği ifade edilmiştir. Rapor (2022)'da, su ürünleri istatistiklerine göre, dünyada balık üretiminde en önde Çin ve Norveç gelmekte ve Türkiye'deki açık deniz kafes yetiştiriciliği (offshore aquaculture) üretiminin zamana bağlı olarak arttığı belirtilmiştir. Üç tarafı denizlerle çevrili olan ayrıca akarsu, göl ve gölet açısından zengin bir konumda bulunan Türkiye, su ürünleri yetiştiriciliği adına sektörel anlamda her geçen yıl daha da büyümekte ve dünyada balık yetiştiriciliği konusunda söz sahibi olma konumunu artırarak korumaktadır.

Su ürünleri yetiştiriciliği, hayvansal proteinlere olan yüksek talepten dolayı, dünyada hızlı gelişen bir gıda üretim endüstrisi haline gelmiştir. Yüksek pazar talebi ve deniz balıklarının ekonomik değeri nedeniyle yetiştiricilik son yıllarda hızla artmıştır. Levrek ve çipura gerek ülkemizde gerekse dünyada deniz balıkları içerisinde en çok üretilen ve tüketilen deniz mahsulleridir. Bu sebeple kültüre alınarak yetiştiriciliği yapılan en önemli balık türleri arasındadır. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK 2021) verilerinde, ülkemizde 2010 yılında çipura üretimi 28.157 ton ve levrek üretimi 50.796 ton iken 2020 yılında sırasıyla 109.749 ve 148.907 tona ulaşarak levrek ve çipura üretiminin giderek arttığı belirtilmiştir. Dünyada en yüksek balık üretimi 2019 yılında 48 milyon ton ile Çin'e aitken, Avrupa'da 834 bin ton ile birincilik ünvanı Türkiye'nin elindedir.

Sektördeki gelişmelere paralel olarak balık hastalıkları da artmış ve işletmeleri tehdit eder hale gelmiştir. Bakteriyel, paraziter, fungal ve viral etkenlerden kaynaklanan balık hastalıkları su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli bir problem haline gelmiştir. Viral etkenler içerisinde Viral Nervöz Nekrozis Virüsü (VNNV) su ürünleri endüstrisi üzerinde yüksek etkiye sahip ana patojenlerden birisidir. Balık ihracatında en önemli yeri tutan levrek ve çipura balıkları başta olmak üzere diğer balık türlerini

de giderek etkisi altına alan VNNV için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu alışma ile Akdeniz bölgesinde bulunan lagünlerde (Akyatan, Akgöl-Paradeniz ve Beymelek) yıl içerisinde düşük ve yüksek su sıcaklığına sahip mevsimlerde doğal şartlarda yetişen deniz balıklarında (Levrek, ipura ve Kefal) VNNV'nin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Tez konusunun belirlenmesi ve yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen çok değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Sibel YAVRU'ya, doktora eğitimim boyunca engin bilgilerinden yararlandığım hocalarım Sayın Prof. Dr. Atilla şİMşEK'e, Sayın Prof. Dr. Orhan YAPICI'ya, Sayın Prof. Dr. Oya BULUT'a, Sayın Prof. Dr. Oğuzhan AVCI'ya, Sayın Doç. Dr. Irmak DİK'e, Araştırma Görevlisi Sayın Dr. H. Pelin ASLIM'a, Sayın Biyolog Dr. Hasan Sercan PALANCI'ya ve Doktora ğrencisi Sayın Veteriner Hekim Rveyde GÜLBAHÇE'ye teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Ayrıca projenin tez izleme komitesinde yer alan Patoloji Anabilim Dalı ğretim yesi Sayın Prof. Dr. Özgür ÖZDEMİR hocama değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca sürekli bana destek olarak teorik ve pratik bilgilerinden yararlandığım İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden Dr. Glnur KALAYCI'ya, Viroloji bölüm şefi Sayın Dr. Kemal PEKMEZ'e, VNNV zerine çalışmalar yürüten ve laboratuvar uygulamaları konusunda yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Murat KAPLAN'a ve Sayın Veteriner Hekim Fatih ARSLAN'a teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Sahada numune alınmasında desteklerinden ötürü Adana İl Tarım ve Orman Müdürlüğü Su rnleri şubesinden Müdür vekili Sayın Gürdal ERSOY'a, Sayın Hüseyin Hilmi TER'e, Mersin İl Tarım ve Orman Müdürlüğü Su rnleri şubesinden Müdür vekili Sayın Yiğit ALAşEHİR'e, Sayın Mustafa Uğur KÖYLÜ'ye, Akdeniz Su rnleri Araştırma, retme ve Eğitim Enstitüsü Müdürlüğü personeli Sayın Dr. Coşkun Menderes AYDIN'a, Dr. Soner ÇETINKAYA'ya ve Sayın Dr. Canan YAĞCI TZN'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Veteriner Hekim Sayın Ahmet MEFUT'a, Veteriner Hekim Sayın Dr. Eda VURAL'a, ve Uzman Veteriner

Hekim Sayın Ramazan ULUDAĞ'a teŖekkür ederim.

Ayrıca eğitim öğretim hayatım boyunca hep yanımda olarak maddi manevi tüm desteklerini üzerimden esirgemeyen, varlığımı borçlu olduğum rahmetli babam Mesut OĞUZ'a ve cefakar annem Alime OĞUZ'a, hayatın tüm zorluklarını birlikte üstlendiğim sevgili hayat arkadaşım eşim Hilal OĞUZ'a, canım kızım Azra OĞUZ'a ve canım oğlum Tuğra OĞUZ'a da fedakarlıklarından dolayı teŖekkürlerimi sunarım.

Doktora tezimin araştırma projesi olarak yürütülmesinde maddi desteklerinden dolayı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM)'ne ve idari desteklerinden ötürü Akdeniz Su Ürünleri Araştırma, Üretme ve Eğitim Enstitüsü Müdürlüğü'ne teŖekkür ederim.

Ufuk OĞUZ  
Haziran / 2024

## İÇİNDEKİLER

<b>SİMGELER VE KISALTMALAR .....</b>	<b>vii</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>x</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Etiyoloji .....	1
1.1.1. Morfolojik Yapı .....	1
1.1.2. Genomik ve Serolojik Yapı.....	2
1.1.3. Viral Replikasyon.....	4
1.2. Epidemiyoloji .....	5
1.2.1. Enfeksiyonun Dünya’da Yayılımı .....	6
1.2.2. Virusun Bulaşma Yolları.....	9
1.2.3. Balıkların Virusa Karşı Duyarlılık Dönemleri.....	10
1.2.4. Konakçı İmmun Sistemi.....	11
1.2.5. Ülkemizde Betanodaviruslar Üzerine Yapılan Çalışmalar .....	13
1.2.6. Prevalans Durumu .....	15
1.2.7. Persistantlık Durumu.....	15
1.3. Patogenez.....	16
1.4. Klinik Semptomlar.....	18
1.5. Teşhis .....	19
1.5.1. Klinik Gözlem ve Davranış Değişiklikleri.....	19
1.5.2. Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu .....	20
1.5.3. Moleküler Tanı Yöntemleri.....	21
1.5.4. Serolojik Tanı Yöntemleri.....	23
1.5.5. Histopatoloji.....	24
1.5.6. Örnekleme Planı ve Hedef Organ Seçimi .....	26
1.6. Koruma ve Kontrol .....	27
1.6.1. Dezenfeksiyon Önlemleri.....	28
1.6.2. Aşılama .....	29

1.7. Tedavi .....	32
1.8. Örnekleme Yapılan Lagünler ve Özellikleri.....	33
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>35</b>
2.1. Gereç.....	35
2.1.1. Etik Kurul Raporu .....	35
2.1.2. Örneklerin Temin Edildiği Lagünler.....	35
2.1.3. Örnekleme .....	36
2.1.4. Hücre Kültürü.....	37
2.1.5. Referans Virus.....	37
2.1.6. Viral Nükleik Asit Ekstraksiyonu .....	37
2.1.7. RT-qPCR.....	37
2.2. Yöntem .....	37
2.2.1. Örneklerin Alınması.....	37
2.2.2. Laboratuvara Getirilen Örneklerin Kaydedilmesi.....	38
2.2.3. İstatistik Analiz .....	38
2.2.4. Balıkların Makroskobik Muayenesi ve Örneklerin Alınması .....	40
2.2.5. Örneklerin Hazırlanması .....	41
2.2.6. Hücre Kültürünün Hazırlanması .....	42
2.2.7. Referans Virusun Üretilmesi.....	43
2.2.8. Referans Virusun Mikrotitrasyon Yöntemiyle Titrasyonu .....	43
2.2.9. RNA Ekstraksiyonu .....	44
2.2.10. Mastermix Hazırlama.....	45
2.2.11. RT-qPCR.....	45
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>47</b>
3.1. Örnekleme Bölgesi ve Örneklere Ait Bulgular .....	47
3.1.1. Balıkların Boy ve Ağırlık Bulguları.....	47
3.1.2. Örnekleme Dönemlerine Göre Lagünlerin Su Sıcaklıkları .....	62
3.1.3. Makroskobik Muayene Bulguları .....	62
3.2. Hücre Kültürü .....	63
3.3. Referans Betanodavirusun Üretilmesi .....	63

3.3.1. Referans Betanodavirusun Titresi .....	65
3.4. Saha Örneklerinde Betanodavirus Varlığı .....	65
3.4.1. RT- qPCR Sonuçları .....	65
3.5. Saha Örneklerinden Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu .....	67
<b>4. TARTIŞMA .....</b>	<b>68</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>79</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>80</b>
<b>7. EKLER.....</b>	<b>92</b>
EK-A: Etik Kurul Raporu.....	92
<b>8. TURNİTİN RAPORU .....</b>	<b>94</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>95</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

aa	Aminoasit
BB	Barramundi Brain
BF	Bluegill Fry
BFNNV	Barfin flounder nervous necrosis virus
CHSE-214	Chinook Salmon Embryo
cm	Santimetre
cm <sup>2</sup>	Santimetre kare
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
CPE	Sitopatik Etki
Ct	Cycle threshold
DIEV	Dicentrarchus Labrax Encephalitis Virus
DKID <sub>50</sub>	Doku Kültürü İnfektif Doz 50
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EM	Electron Microscopy
EPC	Epithelioma Papulosum Cyprini
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FBS	Fotal Bovine Serum
FCR	Feed Conversion Ratio
FHM	Fathead Minnow Cell Line
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue
GiALT	Gill Associated Lymphoid Tissue
GF-1	Grouper Fin
gr	Gram
ha	Hektar
HSP's	Heat Shock Proteins
HHNNV	Hippoglossus Hippoglossus Nervous Necrosis Virus
ICTV	International Committee of Taxonomy of Viruses
IHC	Immunohistochemistry
IL	İnterlökin
IFAT	İndirekt Floresan Antikor Testi

IFN	İnterferon
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
JFNNV	Japanase Flounder Nervous Necrosis Virus
kb	Kilo Baz
L-15	Leibovitz Medium
MALT	Mucosal Associated Lymphoid Tissues
MGP	Magnetic Glass Particles
ml	Mililitre
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
mWs	Miliwat saniye
nm	Nanometre
nt	Nükleotit
O <sub>3</sub>	Ozon
OD	Optical Density
PCR	Polimeraz Chain Reaction
PMol	Pikomol
RdRp	RNA bağımlı RNA Polimeraz
RGNNV	Red-spotted grouper nervous necrosis virus
RNA	Ribonükleik asit
dsRNA	Double Stranded RNA
siRNA	Silencing RNA
Rpm	Revolutions Per Minute
RPS	Relative Percent Survival
RT	Reverz Transkriptaz
RTG-2	Rainbow Trout Gonad Cell Line
RT-PCR	Reverz Transkriptaz Polimeraz Chain Reaction
SALT	Skin Associated Lymphoid Tissue
SJNNV	Stripped jack norvous necrosis virus
SSN-1	Striped Snakehead
SH	Standart Hata
TEM	Transmission Electron Microscopy
TNF	Tümör nekrozis faktör
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu

TPNNV	Tiger puffer nervous necrosis virus
UV	Ultraviyole
VER	Viral Ensefalopati ve Retinopati
VLP	Virus Like Particle
VN	Virus Nötralizasyon
VNN	Viral Nervöz Nekrozis
VNNV	Viral Nervöz Nekrozis Virus
WHO	World Health Organization
WOAH	World Organization for Animal Health
°C	Santigrat Derece
µl:	Mikrolitre



## ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Akdeniz Bölgesinde Bulunan Lagünlerdeki (Akyatan, Akgöl-Paradeniz ve Beymelek) Levrek (*Dicentrarchus labrax*), Çipura (*Sparus aurata*) ve Bazı Kefal Türlerinde (*Mugil spp.*) Viral Nervöz Nekrozis (VNN) Virusunun Varlığının Araştırılması**

Ufuk OĞUZ

Veterinerlik Virolojisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2024

VNNV'nin neden olduğu Viral Nervöz Nekrozis (VNN), *nodaviridae* ailesinden betanodavirus genusunda yer alan ve deniz balıklarında yüksek mortalite ile seyreden önemli bir hastalıktır. Bu çalışmada, Akdeniz bölgesinde bulunan lagünlerde doğal olarak yetişen balıklarda (Levrek, Çipura ve Kefal) düşük (15-20°C) ve yüksek (25°C ve üzeri) su sıcaklıklarında VNN virusunun araştırılması amaçlandı.

2021 ve 2022 yıllarında Akdeniz bölgesinde bulunan Adana-Akyatan, Mersin-Akgöl Paradeniz ve Antalya-Beymelek lagünlerinden örnekleme yapıldı. Altı aylık dönemler halinde (Şubat-Mart ve Ağustos-Eylül) 4 kez örnekleme yapıldı. Her türden 30 adet olmak üzere 1080 adet balık örneklendi.

Balıkların beyin ve gözleri alınarak inokulum elde edildi. Elde edilen inokulumlar betanodavirus açısından Real Time RT-PCR (RT-qPCR) metodu ile test edildi. Hücre kültürü çalışması için WOAH'ın VNN referans laboratuvarından (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Dipartimento di Ittiopatologia, Italy) temin edilen ve ulusal referans laboratuvarı olan İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü stoklarında bulunan SSN-1 (*Striped Snakehead*) hücre hattı ve referans betanodavirus suşu (475/198) kullanıldı. Referans betanodavirus, SSN-1 hücrelerine inokule edilerek 25 °C'da inkübe edildi ve inokulasyonu takip eden 7. günde vakuolizasyon ve lizis ile seyreden CPE oluşumu belirlendi. CPE belirlenen virus hücre süspansiyonu, 1 ml'lik cryoviallere porsiyonlanarak RT-qPCR'da pozitif kontrol virus olarak kullanılmak üzere -80 °C'da stoklandı. Çalışma sonunda örneklerin hiçbirinde betanodavirus nükleik asiti tespit edilmedi.

Çalışma ile Akdeniz bölgesinde bulunan lagünlerden örneklenen Levrek, Çipura ve Kefal balıklarında VNNV varlığı ilk kez araştırıldı. Sonuç olarak, örneklenen balık türlerinde VNNV tespit edilmemiş olsa da etken yönünden periyodik kontrollerin yapılarak daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Akdeniz; Balık; Real Time RT-PCR (RT-qPCR); SSN-1; VNN

## SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY  
SELÇUK UNIVERSITY  
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

**Investigation of Viral Nervous Necrosis (VNN) Virus in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*), Sea Bream (*Sparus aurata*) and Some Mullet Species (*Mugil spp.*) in Lagoons in the Mediterranean Region (Akyatan, Akgöl-Paradeniz and Beymelek)**

Ufuk OĞUZ

Department of Veterinary Virology

PhD THESIS / KONYA-2024

Viral Nervous Necrosis (NNV) caused by VNNV is an important disease that belongs to the betanodavirus genus from the *Nodaviridae* family and progresses with high mortality in marine fish. In this study, it was aimed to investigate the VNN virus in fish (Sea Bass, Sea Bream and Mullet) growing naturally in lagoons in the Mediterranean region at low (15-20°C) and high (>25°C) water temperatures.

Fish samplings were made from Akyatan Lagoon-Adana, Akgöl Paradeniz Lagoon-Mersin and Beymelek Lagoon-Antalya between 2021 and 2022. Sampling was carried out 4 times in six-month periods (February/March-August/September). A total of 1080 fish, 30 of each species, were sampled.

The inoculum was obtained by taking the brains and eyes of the fishes. Obtained inoculum was tested for NNV by Real Time RT-PCR (RT-qPCR) method. For the cell culture study, SSN-1 (*Striped Snakehead*) cell line and reference betanodavirus strain (475/198) were obtained from WOA's VNN reference laboratory (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Dipartimento di Ittiopatologia, Italy) and the stocks of the national reference laboratory, Bornova Veterinary Control Institute, Izmir. Reference betanodavirus was inoculated into SSN-1 cells and incubated at 25 °C, and CPE formation with vacuolization and lysis was determined on the 7th day following inoculation. The CPE determined virus cell suspension was portioned into 1 ml cryovials and stored at -80 °C to be used as a positive control virus in RT-qPCR. At the end of the study, betanodavirus nucleic acid was not detected in any of the samples.

In this study, the presence of VNNV in Sea Bass, Sea Bream and Mullet fish sampled from lagoons in the Mediterranean region was investigated for the first time. As a result, although NNV was not detected in fishes sampled from the lagoons, more research should be carried out to make periodic controls for the agent.

**Keywords:** Fish; Mediterranean; Real Time RT-PCR (RT-qPCR); SSN-1; NNV

## 1. GİRİŞ

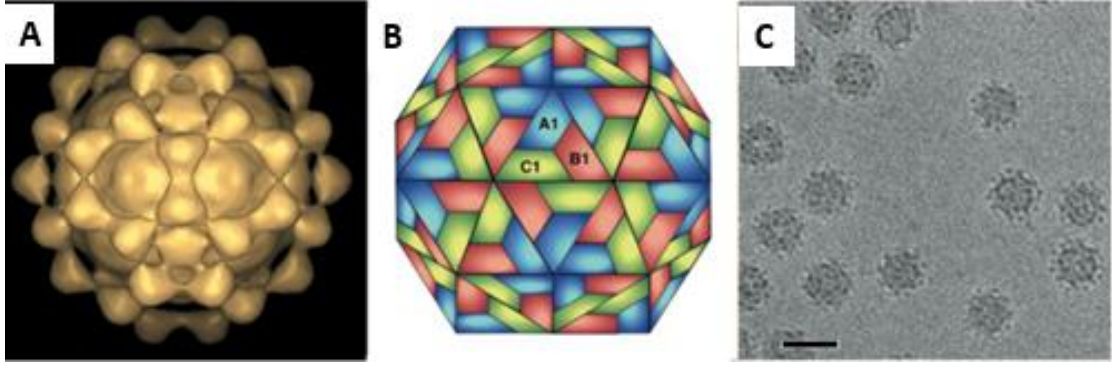
Viral Ensefalopati ve Retinopati (VER) ya da bilinen en yaygın ismiyle Viral Nervöz Nekrozis Virus (VNNV)'u, *Nodaviridae* ailesinden betanodavirus genusunda yer alır (Mori ve ark 1992, ICTV 2022). VNNV, başta deniz balıkları olmak üzere birçok tatlı su türlerinden de izole edilmiştir (Bovo ve ark 2011, Bandín ve Souto 2020). Viral Nervöz Nekrozis (VNN), Glazebrook ve Campbell (1987) tarafından 1980'lerin sonlarında, ilk kez Avustralya'da asya levreği (*Lateolabrax japonicus*)'nde tespit edilen, yüksek bulaşıcılığa sahip viral bir enfeksiyondur. Breuil ve ark (1991) tarafından picorna benzeri virus olarak adlandırılan etken, daha sonra Mori ve ark (1992) tarafından kral balığı (*Pseudocaranx dentex*) larvalarından izole edilerek, *Nodaviridae* ailesinin bir üyesi olarak kabul edilmiştir. Etken (VNNV), Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi (International Committee of Taxonomy of Viruses - ICTV)'nin 1997 yılında Kudüs'deki toplantısında *Nodaviridae* ailesinden betanodavirus genusuna dâhil edilmiştir (Pringle 1997). Son olarak 2022 yılının Temmuz ayında yapılan toplantıda alınan kararla betanodavirusların mevcut sınıflandırması güncelliğini korumaktadır (ICTV 2022).

Enfeksiyonun klinik seyri suyun sıcaklığına, etkilenen balığın türüne, viral yüke ve etkileyen virusun genotipine göre değişkenlik gösterir. Bu nedenle hastalığın, balıkların özellikle larval ve juvenil dönemlerinde daha ağır seyrettiği ancak yetişkin balıklarda az da olsa ölüme neden olduğu bildirilmiştir (Munday ve ark 2002, Panzarin ve ark 2012). Dünya'da giderek artan betanodavirus kaynaklı salgınlar su ürünleri yetiştiriciliğinde ciddi anlamda sorunlar yaratmakta ve ekonomik olarak da sektöre büyük darbeler vurmaktadır (Toffan ve ark 2017, Bandín ve Souto 2020, Johnstone ve ark 2022).

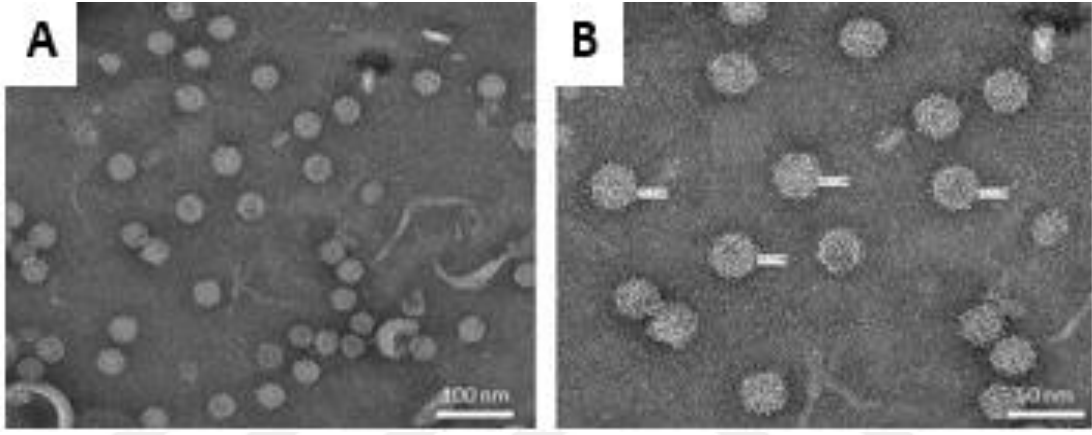
### 1.1. Etiyoloji

#### 1.1.1. Morfolojik Yapı

Etken, *Nodaviridae* familyasından betanodavirus genusunda yer alan, ikosahedral simetrik, 25-30 nanometre (nm) çapında, pozitif polariteli, tek sarmallı, zarsız ve iki segmentli RNA1 (3.1 kb) ve RNA2 (1.4 kb) genomundan oluşan bir RNA virusudur (Nishizawa ve ark 1997, Dalla Valle ve ark 2001, Iwamoto ve ark 2005, Sahul Hameed ve ark 2019, ICTV 2022) (Şekil 1.1 ve 1.2).



**Şekil 1.1.** Betanodavirusa ait şematik ve elektron mikroskopi (EM) görüntüsü. (A). İkosahedral simetriye sahip virusun şematik gösterimi (B). Virus benzeri yapıların cryo-electron mikroskop görüntüsü (C), bar: 40 nm (Tang ve ark 2002).



**Şekil 1.2.** Betanodavirus'un TEM ile iki farklı büyütmede çekilmiş görüntüsü. A. 100 nm, B. 50 nm (Marsian ve ark 2019).

### 1.1.2. Genomik ve Serolojik Yapı

VNNV, RNA1 ve RNA2 genomuna sahip bir RNA virusudur (Iwamoto ve ark 2005, Sahul Hameed ve ark 2019, ICTV 2022, Johnstone ve ark 2022). RNA1 segmenti RNA2'ye göre daha büyüktür ve 3100 nükleotit (nt)'ten oluşur. RNA1 segmenti replikasyon için gerekli tüm bilgilere sahiptir ve protein A'yı kodlar. RNA1, RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) enziminin sentezinden sorumlu olup ayrıca subgenomik RNA3'ün üretimi ve virusun termoregülasyonundan da sorumlu segmenttir (Johnson ve ark 2003, Panzarin ve ark 2014, Sahul Hameed ve ark 2019). RNA1 segmentinin uzunluğu, konakçıdan konakçıya farklılık göstermekle birlikte, 3100 ve 3112 nt arasında değişmektedir (Okinaka ve Nakai 2008). Ayrıca RNA1 geninde 1-445 aminoasit (aa) pozisyonunda yer alan protein A'nın, virusun sıcaklık aktivitesinde rol aldığı bildirilmiştir (Hata ve ark 2010, Souto ve ark 2019). Viral replikasyon esnasında RNA1'den ayrılan subgenomik RNA3, yapısal olmayan B1 ve B2 proteinlerini kodlar. B1 proteini, enfekte olmuş hücrelerden yeni viral partiküllerin

salınmasını sağlamak amacıyla replikasyonun erken aşamasında apoptozu inhibe etmekte ve antinekrotik hücre ölüm fonksiyonunu yerine getirmektedir (Chen ve ark 2009). B2 proteini ise konak hücre antiviral RNA susturma-RNA silencing (siRNA) aktivitesini baskılamakta ve double stranded RNA'nın (dsRNA) korunmasını sağlamaktadır (Iwamoto ve ark 2005, Toubanaki ve ark 2022, Zhang ve ark 2022).

RNA2 segmenti RNA1'e göre daha küçük olup kapsid proteinlerinin kodlanmasından sorumludur (Mori ve ark 1992, Chen ve ark 2009). RNA2 segmentinin uzunluğu virusun genotipine göre değişmektedir (Panzarin ve ark 2014). Tan ve ark (2001), SJNNV genotipinin 1410 nt, DIEV genotipinin 1406 nt, TPNNV ve HHNNV genotiplerinin 836 nt, JFNNV, RGNNV ve BFNNV genotiplerinin ise 830 nt uzunluğunda olduğunu bildirmişlerdir. Virusun genomik sınıflandırması, RNA2 geninin T4 değişken bölgesinin filogenetik analizine göre yapılmış ve başlıca 4 genotip tanımlanmıştır (Nishizawa ve ark 1997, Iwamoto ve ark 2000, Costa ve Thompson 2016, Panzarin ve ark 2016, ICTV 2022, Johnstone ve ark 2022). Bu tanımlamaya göre betanodaviruslar Stripped jack nervous necrosis virus (SJNNV), Tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV), Barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV) ve Red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) olarak sınıflandırılmıştır (Sahul Hameed ve ark 2019, WOA 2019, ICTV 2022) (Tablo 1.1).

**Tablo 1.1.** Betanodavirusların genotipik ve serotipik çeşitliliği (Iwamoto ve ark 2000, WOA 2019).

Genotip	Serotip	Hedef Konakçı	Optimum Su Sıcaklığı
SJNNV	A	Striped jack (Kral balığı)	20-25°C
TPNNV	B	Tiger puffer (Kirpi balığı)	20°C
BFNNV	C	Soğuk iklim su balıkları (Atlantik Halibut, Atlantik Cod, Pisi Balıkları vs.)	15-20°C
RGNNV	C	Ilıman iklim su balıkları (Asya deniz levreği, Avrupa deniz levreği, grouper türleri vs.)	25-30°C

Segmentli yapıda genoma sahip betanodaviruslarda segmentler arası değişim, reassortant genotipe sahip virusların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Costa ve Thompson 2016, Toffan ve ark 2017, Valero ve Cuesta 2023). Lopez-Jimana ve ark (2010), granyöz balığını (*Argyrosomus regius*) hem SJNNV hem de RGNNV genotipi ile enfekte ederek yaptıkları deneysel çalışmada, granyöz balığından reassortant genotipe sahip betanodavirus tespit ettiklerini ifade etmişlerdir.

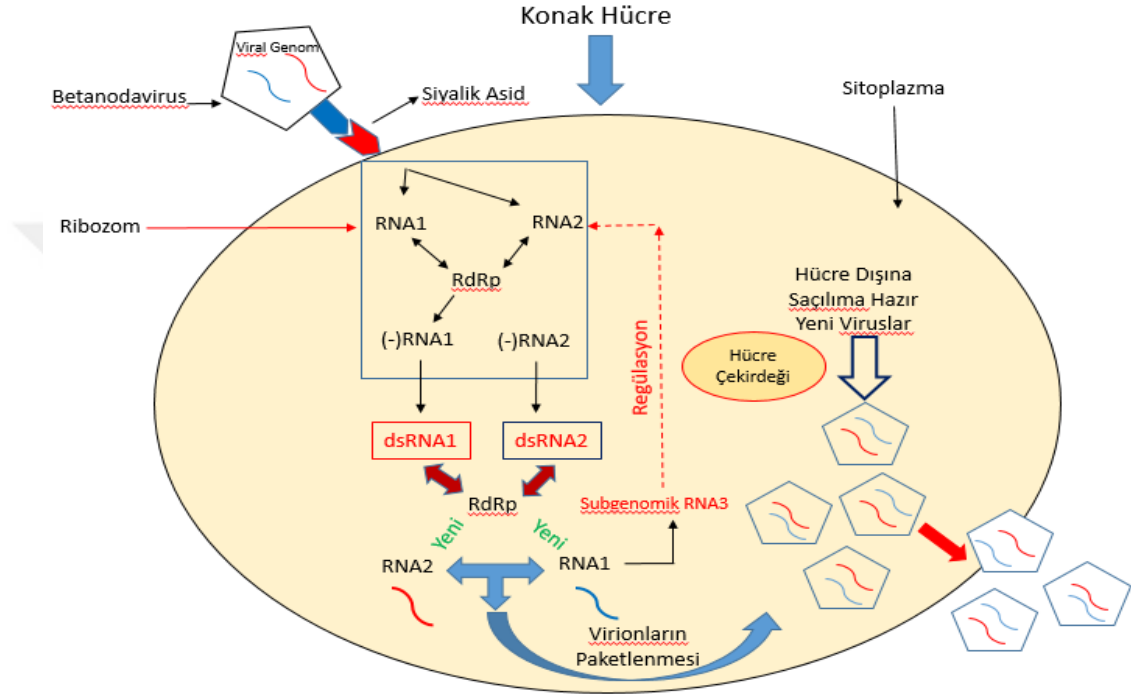
Portekiz ve İspanya’da çipura ve dil balığı yetiştirilen çiftliklerdeki balıklarda RGNNV/SJNNV reassortant genotipe sahip betanodavirus genomu PCR ile tespit edilmiştir (Oliveira ve ark 2009). Panzarin ve ark (2012), 2000-2009 yılları arasında Avrupa’nın farklı bölgelerinden elde ettikleri 120 viral izolatın RNA1 ve RNA2 geninin kısmi sekansı ile genotiplendirme çalışması yapmışlardır. İnceledikleri 120 izolatın; 96’sının RGNNV, 1’inin SJNNV ve 23’ünün ise RGNNV/SJNNV reassortant virus olduğunu bildirmişlerdir (Panzarin ve ark 2012). Birçok çalışmada (Oliveira ve ark 2009, Lopez-Jimana ve ark 2010, Toffan ve ark 2017, Volpe ve ark 2020, Toffan ve ark 2021), RGNNV ve SJNNV genotiplerinin RNA1 ve RNA2 genlerinin değişimi ile RGNNV/SJNNV ve SJNNV/RGNNV reassortant genotiplerin tespit edildiği bildirilmiştir (Padrós ve ark 2022) . Portekiz, İspanya, İtalya, Yunanistan ve Türkiye gibi bazı Akdeniz ülkelerinde RGNNV/SJNNV reassortant genotiplerin birçok balık türünde tespit edildiği ifade edilmiştir (Oliveira ve ark 2009, Lopez-Jimana ve ark 2010, Toffan ve ark 2017, Kaplan ve ark 2022a).

Mori ve ark (2003), poliklonal antikorlar kullanılarak Virus Nötralizasyon (VN) ve İndirekt Florasan Antikor (IFA) testleri ile yaptıkları çalışmada, betanodavirus genotiplerini A, B ve C olmak üzere 3 serotipe ayırmışlardır. SJNNV genotipinin serotip A, TPNNV’nin serotip B, BFNNV ve RGNNV’nin ise serotip C ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Mori ve ark 2003, WOAHA 2019). Ancak Panzarin ve ark (2016), ağırlıklı olarak Asya kıtasından toplanan virus izolatları ile sınıflandırma yapıldığını, sınırlı bir bölgede çalışılması nedeni ile sonucun genelleme için yeterli olamayacağını ifade etmişlerdir. Panzarin ve ark (2016), Mori ve ark (2003)’nın yaptığı çalışmaya göre Avrupa ve Asya izolatları dâhil farklı bölgelerden elde ettikleri izolatlarla çalıştıklarını ve buna göre BFNNV genotipinin serotip C yerine serotip B grubunda değerlendirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir (Bandín ve Souto 2020).

### **1.1.3. Viral Replikasyon**

Betanodavirusların replikasyonu ile ilgili pek çok çalışma (Lu ve ark 2003, Liu ve ark 2005, Panzarin ve ark 2014, Den Boon ve ark 2022) yapılmıştır. Pozitif polariteli RNA virusları duyarlı hücrelerin sitoplazmalarında replike olur (Harak ve Lohmann 2015). Betanodaviruslar duyarlı hücre zarında bulunan siyalik asid reseptörüne bağlanarak endositoz yolu ile konak hücreye girerler ve genomlarını sitoplazmaya bırakırlar (Lu ve ark 2003, Liu ve ark 2005). Takiben hücre ribozomları

viral (+) RNA1'i viral RNA'ya bağımlı RNA polimeraz'a (RdRp) çevirir. Daha sonra, (+) RNA1'den (-) RNA1 sentezlenerek dsRNA oluşur. dsRNA, yeni sentezlenen RNA1'i transkripsiyon için kullanır. Sentezlenen RNA1'in 3' ucundan subgenomik RNA3 oluşur. Subgenomik RNA3, RNA2'nin sentezini de düzenleyerek yeni RNA2'lerin sentezlenmesini regüle eder. Daha sonra yeni oluşan RNA1 ve RNA2'ler paketlenerek yeni virionlar oluşur (Lu ve ark 2003, Liu ve ark 2005, Bandín ve Souto 2020) (Şekil 1.3).



**Şekil 1.3.** Betanodavirusların replikasyon siklusunu gösteren şematik bir görüntü. RdRp: RNA bağımlı RNA polimeraz enzimi.

RNA1 geninde 1-445 aa pozisyonunda bulunan protein A'nın virusun sıcaklık aktivitesinde rol aldığı ve termoregülasyondan sorumlu olduğu bildirilmiştir (Hata ve ark 2010, Panzarin ve ark 2014, Souto ve ark 2019, Bandín ve Souto 2020). Panzarin ve ark (2014) yaptıkları bir çalışmada, farklı inkubasyon sıcaklıklarında E-11 hücre hattına inokule ettikleri virusun 0-165 saat aralığında hücrelerde meydana getirdiği değişiklikleri gözlemlemişlerdir. Araştırmada (2014) virus inokulasyonunun ardından 15°C'da, 165. saate kadar hücrelerde belirgin bir sitopatik etki (CPE) belirlenemezken, 20°C ve üzerindeki inkubasyon sıcaklıklarında 69. saatin sonundan itibaren hücrelerde CPE gösteren alanlar gözlemlendiği bildirilmiştir.

## 1.2. Epidemiyoloji

Betanodaviruslar dünyada yaygın olarak bulunmaktadır (Bandín ve Souto

2020, Johnstone ve ark 2022). Virusun en çok etkilediği türlerin başında Asya ve Avrupa levreği, Çipura, Japon pisi balığı, Atlantik cod, Atlantik halibut ve Grouper (Lahoz, orfoz) gibi balık türleri gelmektedir (Bandín ve Souto 2020, García-Álvarez ve ark 2022). Larval ve juvenil dönemdeki balıklarda morbidite ve mortalite oranı yüksekken, yetişkin balıklarda mortalite oranı kısmen daha düşüktür (Munday ve ark 2002, Costa ve Thompson 2016, Toffan ve Panzarin 2020, Valero ve Cuesta 2023).

Etken, su ortamında oldukça dayanıklıdır (Frerichs ve ark 2000, WOAHA 2019). Virusun, deniz suyunda düşük sıcaklıklarda uzun süre canlılığını koruyabildiği fakat su ortamı dışında sitopatojenitesini kolay bir şekilde kaybettiği ifade edilmiştir (Maltese ve Bovo 2007, WOAHA 2019, Bandín ve Souto 2020). Ayrıca VNN virusu dondurulmuş balıklarda uzun bir süre enfeksiyözitesini koruyabilmektedir (Mori ve ark 2005, Bovo ve ark 2011). Bu sebeple dondurulmuş balıkların yem olarak kullanılmasının enfeksiyon için potansiyel bir risk oluşturacağı bildirilmektedir (WOAHA 2019).

### **1.2.1. Enfeksiyonun Dünya’da Yayılımı**

Betanodaviruslar dünyanın birçok bölgesinde özellikle deniz ve tatlı su balıklarında tespit edilmiştir (Tablo 1.2-1.3) (Bandín ve Souto 2020, Vázquez-Salgado ve ark 2023). VNN enfeksiyonu özellikle Asya ve Avrupa ülkeleri başta olmak üzere dünyanın birçok yerinde su ürünleri yetiştiriciliği yapılan çiftliklerde büyük bir sorun haline gelmiştir (Bandín ve Souto 2020, Sánchez ve ark 2022, Zrnčić ve ark 2022). Asya ülkeleri (Çin, Hindistan, Endonezya, Japonya, Kore, Malezya, Filipinler, Tayland, İran, İsrail), Avrupa ülkeleri (İtalya, İspanya, Yunanistan, Malta, Portekiz, İngiltere, Norveç, Hırvatistan, Türkiye), Avusturalya ve Kuzey Amerika’da betanodavirus varlığı bildirilmiştir (WOAHA 2019, Kaplan ve ark 2023, Vázquez-Salgado ve ark 2023). Dünyada 120’den fazla balık ve omurgasız canlı türlerinde virus tespit edilmiş olup bunların büyük bir çoğunluğunu denizde yaşayan balık türleri oluşturmaktadır (Costa ve Thompson 2016, WOAHA 2019, Bandín ve Souto 2020). Ayrıca çift kabuklularda (midye, ıstakoz ve karides) da betanodavirus varlığı bildirilmiştir (Gomez ve ark 2008, Johnstone ve ark 2022).

**Tablo 1.2.** Betanodavirusların dünyada tespit edildiği deniz balığı türleri.

Balık Türü	Latince İsmi	Virusun Genotipleri	Ülke	Kaynaklar
Avrupa Deniz Levreği	<i>Dicentrarchus labrax</i>	RGNNV, SJNNV/RGNNV, RGNNV/SJNNV	İspanya, Portekiz, İsrail, İtalya, Hırvatistan, Türkiye	Skliris ve ark 2001 Ucko ve ark 2004 Gomez ve ark 2010 Panzarin ve ark 2010 Kalaycı ve ark 2016 Kaplan ve ark 2021 Kaplan ve Karaoğlu 2021 Sitar ve ark 2021 Vázquez-Salgado ve ark 2023
Çipura	<i>Sparus aurata</i>	RGNNV, RGNNV/SJNNV	Yunanistan, Basra Körfezi, Fransa, İtalya, İspanya, Portekiz, Türkiye	Castric ve ark 2001 Athanassopoulou ve ark 2003 Olveira ve ark 2009 Gomez ve ark 2010 Kalaycı ve ark 2016 Naveen Kumar ve ark 2017 Toffan ve ark 2017 Berzak ve ark 2019 Savoca ve ark 2021 Kaplan ve ark 2022a Ucko ve ark 2004 Hassantabar ve ark 2021
Kefal	<i>Mugil sp.</i>	-	İsrail, İran	Ucko ve ark 2004 Hassantabar ve ark 2021
Asya Deniz Levreği	<i>Lates calcarifer</i>	RGNNV	Japonya, İsrail, Hindistan, Malezya	Gomez ve ark 2004 Ucko ve ark 2004 Ransangan ve Manin 2010 Sharma ve ark 2019 Mori ve ark 1992
Kral Balığı	<i>Pseudocaranx dentex</i>	SJNNV	Japonya	Mori ve ark 1992
Orfoz	<i>Epinephelus marginatus</i>	RGNNV	İtalya, Cezayir, İspanya	Vendramin ve ark 2013 Kara ve ark 2014 Valencia ve ark 2019
Kalkan	<i>Scophthalmus maximus</i>	RGNNV	İspanya	Olveira ve ark 2013
Japon Papağan	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	-	Japonya	Yoshikoshi ve Inoue 1990
Barbun	<i>Mullus barbatus</i>	RGNNV	İtalya, Türkiye	Athanassopoulou ve ark 2003 Kaplan ve ark 2023 Ucko ve ark 2004
Lahoz	<i>Epinephelus aeneus</i>	RGNNV	İsrail	Ucko ve ark 2004
Pisi	<i>Verasper moseri</i>	BFNNV	Japonya	Nizhizawa ve ark 1997
Mercan	<i>Pagrus major</i>	RGNNV	Japonya, Kore	Moreno ve ark 2014 Kim ve ark 2018
Fugu	<i>Takifugu rubripes</i>	TPNNV	Japonya	Moreno ve ark 2014
Atlantik halibut	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	-	Norveç, İskoçya	Grotmol 1995 Starkey ve ark 2000
Zargana	<i>Belone belone</i>	RGNNV/SJNNV	Türkiye	Kaplan ve ark 2023
Karides	<i>Aeoliscus strigatus</i>	RGNNV	Kore Akdeniz	Gomez ve ark 2006 Johnstone ve ark 2022

**Tablo 1.3.** Betanodavirusların dünyada tespit edildiği tatlı su balığı türleri.

Balık Türü	Latince İsmi	Virusun Genotipleri	Ülke	Kaynaklar
Yayın	<i>Parasilurus asotus</i>	RGNNV	Tayvan	Chi ve ark 2003
Mersin	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	-	Yunanistan	Athanassopoulou ve ark 2004
Japon	<i>Carassius auratus</i>	-	Hindistan	Jithendran ve ark 2011
Tilapya	<i>Oreochromis niloticus</i>	RGNNV	Tayland Mısır	Keawcharoen ve ark 2015 Taha ve ark 2020
Lepistes	<i>Poecilia reticulata</i>	RGNNV	Singapur	Hegde ve ark 2003
Yılan	<i>Anguilla anguilla</i>	RGNNV	Tayvan	Chi ve ark 2003

Betanodavirus kaynaklı salgınların ortaya çıkışında virusun farklı genotiplerinin olması, virustan etkilenen balık türünün fazlalığı ve su sıcaklığı etkili olmaktadır (Bandín ve Souto 2020, Toffan ve ark 2021, Zrnčić ve ark 2022). Asya ve Avrupa’da PCR ile betanodavirus genom varlığı tespit edilen izolatlar ile yapılan çalışmada virusun genotiplendirmesi yapılmıştır (Bandín ve Souto 2020). VNNV tespit edilen örneklerden; % 86’sı RGNNV, % 5.5’i SJNNV ve % 1,8’i ise BFNNV genotipini oluşturmaktadır (Bandín ve Souto 2020). RGNNV genotipi daha çok ılıman iklime sahip Akdeniz ve Asya ülkelerinde 25 °C ve üzerindeki su sıcaklığına sahip sularda; kefal (*Mugil cephalus*), asya deniz levreği (*Lates calcarifer*), çizgili levrek (*Pseudocaranx labrax*), grouper (orfoz, lahoz) (*Epinephelus* sp.), çipura (*Sparus aurata*), senegal dil balığı (*Solea senegalensis*) ve avrupa deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*) gibi türlerde tespit edilmiştir (Bandín ve Souto 2020). SJNNV genotipinin ise 20-25 °C su sıcaklığına sahip sularda, Japonya ve İber yarımadasında bulunduğu ifade edilmiştir (Cutrín ve ark 2007). TPNNV genotipinin Japonya’da tiger puffer-kirpi balığı (*Takifugu rubripes*)’nda tespit edildiği bildirilmiştir (Nishizawa ve ark 1997).

BFNNV genotipi daha çok Japonya, Amerika ve Avrupa’nın kuzeyinde yer alan ülkelerde soğuk su balık türlerinde tespit edilmiştir (Bandín ve Souto 2020). Bu türler atlantik cod (*Gadus macrocephalus*), pasifik cod (*Gadus morhua*), mezigit (*Melanogrammus aeglefinus*), atlantik halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) ve barfin pisi balığı (*Verasper moseri*) gibi soğuk iklim şartlarında yaşayan balıklardır (Nylund ve ark 2008, Bandín ve Souto 2020).

Farklı genotipe sahip betanodavirusların aynı hücreyi enfekte etmesi durumunda segmentler arası gen değişimi ile reassortant tip betanodaviruslar oluşabilir (Toffan ve ark 2021, Valero ve Cuesta 2023). Yapılan çalışmalarda (Athanassopoulou

ve ark 2003, Toffan ve ark 2017, Bitchava ve ark 2019, Volpe ve ark 2020, Kaplan ve ark 2022a) reassortant genotipe sahip betanodavirusların Yunanistan, İtalya ve Türkiye’de tespit edildiği bildirilmiştir.

### 1.2.2. Virusun Bulaşma Yolları

Betanodavirus enfeksiyonlarında bulaşma horizontal ve vertikal yolla gerçekleşmektedir (Munday ve ark 2002, Doan ve ark 2017, Bandín ve Souto 2020, Volpe ve ark 2020, Zrnčić ve ark 2022).

#### Horizontal Bulaşma

Betanodaviruslar üzerine yapılan çalışmalarda horizontal bulaşma, canlı ya da cansız varlıklar vasıtasıyla gerçekleşebilmektedir (Ahmad ve ark 2019, Berzak ve ark 2019, Bandín ve Souto 2020, Zrnčić ve ark 2022). Kuluçkahanede kullanılan çizmeler, ağlar, canlı/cansız yemler, personel ve su horizontal bulaşmanın önemli sebepleri arasındadır (Gomez ve ark 2008, Shetty ve ark 2012, Volpe ve ark 2020). Horizontal bulaşmada en önemli yer su ortamlarıdır (WOAH 2019, Vázquez-Salgado ve ark 2020, Zrnčić ve ark 2022). Ayrıca çiftlikler arası anaç balık ve yumurta alışverişi, doğadan alınan asemptomatik balıkların anaç olarak kullanımı da viral enfeksiyonların bulaşmasını etkilemektedir (Vázquez-Salgado ve ark 2020). Gerek doğal yaşam alanlarında (deniz, okyanus, göl, akarsu) gerekse çiftlik şartlarında yaşayan balıklar ile yumuşakçalardan kabuklulara, canlı yemlerden (rotifer, artemia) balıkla beslenen kuşlara kadar betanodavirusların birçok yolla taşınabileceği bildirilmektedir (Munday ve ark 2002, Gomez ve ark 2008, Hick ve ark 2011, Volpe ve ark 2017, Vázquez-Salgado ve ark 2020). Vázquez-Salgado ve ark (2020), yaptıkları bir çalışmada, artemia (*Artemia nauplii*) ve rotifer (*Brachionus plicatilis*) canlı yemlerini RGNNV/SJNNV reassortant betanodavirus suşu ile enfekte ederek, dil balığı (*Solea senegalensis*) larvalarında bu canlı yemlerin enfeksiyon oluşturup oluşturmadığını araştırmışlardır. Araştırma (2020) sonunda, betanodavirus ile enfekte edilen bu canlı yemlerin larvalara oral yolla verildikten 8 gün sonra larvalarda ölümler gözlenmiştir. Ölen larvalardan elde edilen örneklerde PCR ile betanodavirus genom varlığı ortaya konulmuştur. Ayrıca Gomez ve ark (2008), Güney Kore’de denizde doğal şartlarda yetişen sert kabuklu yumuşakçalarda (karides, yengeç ve midye) yaptıkları bir çalışmada, PCR ile 118 örnekten 4’ünde betanodavirus viral genomunu tespit

ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri bu sonuçlara göre doğal şartlarda yetişen enfekte sert kabuklu yumuşakçalardan betanodavirusların denizde kültürü yapılan balıklara horizontal yolla bulaşabileceğini ifade etmişlerdir.

### **Vertikal Bulaşma**

Betanodavirusların duyarlı balık türlerinde vertikal yolla bulaştığına dair birçok çalışma bulunmaktadır (Arimoto ve ark 1992, Breuil ve ark 2002, Munday ve ark 2002, Maltase ve Bovo 2007, Doan ve ark 2017, Ahmad ve ark 2019, Taha ve ark 2020). Çizgili levrek, barfin pisi balığı, çipura ve avrupa deniz levreği'nin üreme organlarında betanodavirusa ait viral genomun tespit edildiği ve bu türlerde virusun vertikal yolla bulaşmada etkili olduğu ifade edilmiştir (Castric ve ark 2001, Breuil ve ark 2002, Bandín ve Souto 2020). Yapılan birçok çalışmada (Nishizawa ve ark 1996, Dalla Valle ve ark 2000, Valero ve ark 2015, Valero ve ark 2018, Taha ve ark 2020), betanodavirusa duyarlı balıkların üreme organlarında betanodavirusa ait viral genomun PCR ile tespit edildiği bildirilmiştir. Valero ve ark (2015) yaptıkları deneysel bir çalışmada, levrek ve çipura testislerinin betanodavirusların tropizmi için uygun organlar olduğunu ifade etmişlerdir.

Taha ve ark (2020), Mısır'da kitlesel balık ölümlerinin görüldüğü tilapya (*Oreochromis niloticus*) yetiştirme çiftliklerinde yaptıkları araştırmada ölen balıkların beyin, göz ve ovaryumlarında betanodavirus viral genomunu tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada (2020), araştırmacılar örneklenen tüm tilapya larvalarından betanodavirus tespit edildiğini ifade etmişlerdir. Buna göre araştırmacılar betanodavirusa duyarlı anaç balıkların gonadlarında ya da sperm keselerinde bulunan virusun enfeksiyona neden olabileceği değerlendirmişlerdir.

### **1.2.3. Balıkların Virusa Karşı Duyarlılık Dönemleri**

Kendall (1984), balıkların erken gelişim evrelerini yumurta, larva (hatchling, fry, fingerling) ve juvenil evreleri olarak üç ana gruba ayırarak tanımlamıştır. Yumurta evresi, döllenme sonrası embriyo aşamasını ifade etmektedir. Larval evre ise embriyonun yumurtadan çıkarak yüzgeç ışınlarının ve koruyucu pullarının geliştiği evreyi ifade etmektedir. Larval evre içerisinde, yumurtadan çıktıktan sonra beslenme organlarının gelişmediği hatchling evresinde yumurtada 'sac fry' denilen bir beslenme kesesi bulunmaktadır. Bu dönemde larva, bu besin kesesi ile beslenme ihtiyacını

sağlamaktadır. Fry olarak adlandırılan bir sonraki larval evre ise balığın besin kesesinin düştüğü, hareket edebilmek ve beslenmek için gerekli organlarının gelişerek flanktonlar (fitoflankton, zooflankton) ile beslenmeye başladığı dönemdir. Fingerling evresi, balığın tipik olarak ortalama bir insan parmağı boyutuna ulaştığı ve flankton ile beslenmeden normal beslenme evresine geçtiği morfolojik olarak balığa benzemeye başladığı dönemdir. Juvenil dönem ise tüm yüzgeç ışınlarının geliştiği fakat pulların gelişiminin devam ettiği cinsel olgunluğa ulaşmış balığın gençlik dönemini ifade etmektedir (Kendall 1984, Kunz-Ramsay 2013).

Larval ve juvenil dönemdeki balıklar betanodavirus enfeksiyonlarına karşı çok duyarlı iken, yetişkin balıklar daha az duyarlıdır (WOAH 2019, Bandín ve Souto 2020, Valero ve Cuesta 2023). Levreklerin betanodavirusa duyarlı olduğu (Souto ve ark 2015a), buna karşılık çipuraların ise enfeksiyondan etkilenmediği ifade edilmiştir (Castric ve ark 2001, Aranguren ve ark 2002). Ancak yapılan çalışmalarda (Volpe ve ark 2020, Savoca ve ark 2021, Toffan ve ark 2021, García-Álvarez ve ark 2022, Kaplan ve ark 2022a) reassortant genotipe sahip betanodavirusların çipuralarda da enfeksiyona neden olduğu belirtilmektedir.

Larval dönemdeki balıkların immun sistemleri yeterince gelişmediğinden dolayı virustan daha fazla etkilendiği bildirilmektedir (Zorriehzahra 2020). Betanodaviruslara karşı konak hücre immun yanıtı konusunda yetişkin balıklarda yeterince çalışma yapılmışken, larval dönemdeki balıkların gelişim evrelerindeki kısıtlı bilgidendir dolayı daha az çalışma yapıldığı bildirilmektedir (Peruzza ve ark 2021).

#### **1.2.4. Konakçı İmmun Sistemi**

Bağışıklık; bakteri, mantar, parazit ve virus gibi patojenler ile yabancı maddelere karşı vücudu koruyan biyolojik bir savunma mekanizmasıdır (Natnan ve ark 2021). Balıklarda patojenlere karşı hem doğuştan gelen (innate), hem de doğumu takiben zamanla şekillenen (adaptive) bir bağışıklık yanıtı oluşur (Ashfaq ve ark 2019, Toubanaki ve ark 2022). Bağışıklık sistemi, humoral ve hücrel immun yanıt olarak iki mekanizmaya ayrılır. Humoral bağışıklık, kan dolaşımında olan virusların B hücrelerini uyarmasıyla başlar. B hücreleri tarafından üretilen spesifik antikorlar tarafından opsonize edilen viruslar makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Hücrel bağışıklık ise hücre içine giren viruslara karşı sitotoksik T lenfositleri ve natural killer

(NK) hücrelerinin oluşturduğu immun yanıt ile sağlanır (Abram ve ark 2017, Natnan ve ark 2021).

Balıklarda bağışıklığın oluşumunda bazı organ ve dokular önemli görevler üstlenmektedir (Toubanaki ve ark 2022). Organizma bir patojen ile karşılaştığı zaman deri, solungaç ve bağırsaklar patojen için ilk fiziksel bariyeri oluştururlar. (Cabillon ve Lazado 2019, Natnan ve ark 2021, Toubanaki ve ark 2022). Anatomik olarak solungaç kapağının altında bulunan timus ve anterior böbrek (head kidney) balıklarda primer lenfoid organlardır (Cabillon ve Lazado 2019, Natnan ve ark 2021). Ayrıca dalak, karaciğer, mucosal-associated lymphoid tissues (MALT), gut-associated lymphoid tissue (GALT), gill-associated lymphoid tissue (GiALT) ve skin-associated lymphoid tissue (SALT) sekonder lenfoid organ ve dokulardır (Natnan ve ark 2021).

İnterlökin (IL), Interferon (IFN) ve Tümör nekrozis faktör (TNF) gibi sitokinler hücrel immunitenin önemli komponentleridir (Diker 2005, Costa ve Thompson 2016). Betanodavirus enfeksiyonunun hücre içi immun yanıtı tetikleyerek IL-1b, IL-10, TNF ve INF gibi inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (Vaz ve ark 2022). Enfeksiyon durumunda üretilen IL-1b'nin, ilk hücrel bağışıklık tepkisini vererek diğer sitokinlerin de salınımını sağladığı ifade edilmektedir (Poisa-Beiro ve ark 2008, Vaz ve ark 2022). Levrek ve çipuralar üzerinde yapılan deneysel enfeksiyon çalışmalarında (Scapigliati ve ark 2010, Chaves Pozo ve ark 2012) özel T hücre moleküllerinin (TRCb, CD4-2, CD4, CD8a, CB8b, Lck, NCCRP-1 ve ZAP-70) ekspresyonunda artışlar olduğu ve bunların hücrel savunmada etkili olduğu bildirilmiştir (Bandín ve Souto 2020). Jung ve ark (2020) deneysel olarak betanodavirus ile enfekte ettikleri pisi balığında enfeksiyondan 3 gün sonra CD4-1 T hücre moleküllerini tespit etmişler ve 7. günde bu moleküllerin en yüksek seviyeye çıktığını bildirmişlerdir. Vaz ve ark (2022), juvenil boy levreklerde betanodavirus enfeksiyonuna karşı immun yanıtın oluşumu hakkında yaptıkları bir çalışmada enfeksiyondan birkaç saat sonra (6-9 saat) TNF $\alpha$ , CD28 ve IL-1b'nin ekspresyonunda artış olduğunu ifade etmişlerdir. Araştırmada (2022), balıklarda en yüksek mortalite oranının belirlendiği ve klinik semptomların gözlemlendiği 144. saatin sonunda, TNF $\alpha$ , CD28 ve IL-1b konsantrasyonunun en yüksek seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada (2022) sunulan hemotolojik parametrelerde, lökosit ve trombosit sayılarında düşüş, nötrofil ve monosit sayılarında ise artış tespit ettikleri bildirilmiştir. Ayrıca ilk ölümlerin görüldüğü 120. saatin sonunda lenfosit miktarının

düşüş eğilimine girdiği ve en yüksek mortalite oranının görüldüğü 144. saatte ise lenfosit miktarında önemli ölçüde azalma belirledikleri ifade edilmiştir (Vaz ve ark 2022).

Toubanaki ve ark (2023) levreklerde yaptıkları deneysel enfeksiyon ile betanodavirusa karşı oluşan bağışıklıkla ilgili gen ekspresyon profilini araştırarak değerlendirmişlerdir. Bu deneysel enfeksiyon modelinin 28 gün olarak dizayn edildiği ve mortalitenin en yüksek seviyeye (%83) çıktığı 14. günün sonunda hayatta kalan balıkların beyinlerindeki yüksek viral yüke rağmen klinik semptomların ortadan kalkarak mortalitenin düştüğü belirtilmiştir. Araştırmada (2023) bazı sitokinlerin (IL-1b, IL-10 ve IFN-7) günlere göre gen ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Enfeksiyondan sonra, 14. günde IL-1b gen ekspresyonunun önemli düzeyde artış gösterdiği (5.2 kat) ve 28. günün sonunda ise bazal seviyeye düştüğü, IL-10'da ise gen ekspresyonun 7. günde artış (1.7 kat) gösterdiği ve finalde (14.-28. günlerde) bazal seviyeye düştüğü bildirilmiştir. IFN-7 gen ekspresyon seviyesinin enfeksiyondan sonra, 14. günde ciddi bir artış (77 kat) gösterdiği, 28. günün sonunda ise bazal seviyeye düştüğü ifade edilmiştir. Aynı çalışmada (2023), T hücre marker gen ekspresyon seviyelerine bakıldığında CD4 seviyesi 14. günde (1.6 kat) artarken, 28. günde başlangıç seviyelerine gerilemiş, CD8a seviyesi ise 4. günde yaklaşık 4 kat artarken 28. günün sonunda başlangıç seviyelerine gerilemiştir.

Hücresel stres proteinleri olarak da adlandırılan ve canlı organizmalarda bolca bulunan ısı şok proteinleri (Heat Shock Proteins-HSP), balık beyin hücrelerinde bolca bulunmaktadır (Chen ve ark 2010). HSP (HSP70, HSP80 ve HSP90)'lerin, enfeksiyon nedeniyle zarar görmüş sinir hücrelerini onardığı ve antienflamatuar etki gösterdiği ifade edilmektedir (Chen ve ark 2011). HSP90'nın VNNV enfeksiyonlarına karşı etkili olduğunu bildirilmiştir (Chen ve ark 2010, Zenke ve Okinaka 2022).

#### **1.2.5. Ülkemizde Betanodaviruslar Üzerine Yapılan Çalışmalar**

Son yıllarda Türkiye'de VNNV'nin tespitine yönelik yapılan araştırmalar daha da yoğunluk kazanmıştır. Özkan Özyer ve ark (2012) tarafından, 2010 ve 2011 yılları arasında Ege bölgesinde 20 adet kuluçkahane ve 33 adet yetiştirme işletmesinden alınan 1440 adet levrek ve 1260 adet çipura, betanodavirus varlığı açısından incelenmiştir. Çalışma (2012) kapsamında incelenen örneklerin hiçbirinde

betanodavirus viral genomu tespit edilmemiştir. Bu çalışma (2012), ülkesel anlamda betanodavirusların tespitine yönelik yapılan ilk araştırmadır. Daha sonra 2011 yılının Haziran ayında, Mersin’de faaliyet gösteren bir levrek kuluçkahanesinde Balık Hastalıkları Ulusal Referans Laboratuvar (İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü)’ı tarafından yapılan bir çalışmayla, levreklerde PCR ile betanodavirus viral genom varlığı tespit edilmiştir (Özkan Özyer ve ark 2014). Bu araştırma (2014) ülkemizde betanodavirusların levreklerde tespit edildiği ilk çalışmadır.

Balık Hastalıkları Ulusal Referans Laboratuvar’ı tarafından 2012 ve 2014 yılları arasında yapılan başka bir çalışmada ise klinik bulgu göstermeyen sağlıklı görünümlü levrek ve çipura yavrularında betanodavirus tespit edilmiştir (Kalaycı ve ark 2016). Ayrıca bu kuluçkahaneden yavru balık alan başka bir işletmede çalışmaya dahil edilmiş ve buradan örneklenen balıklarda da betanodavirus genom varlığı belirlenmiştir (Kalaycı ve ark 2016).

Kaplan ve ark (2021), Karadeniz bölgesindeki çiftliklerde, 2016-2019 yılları arasında kafeslerde yetiştirilen levreklerde betanodavirus viral genomunu PCR ile tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada (2021) pozitif çıkan örneklerde yapılan filogenetik analiz sonucunda, virusun RGNNV genotipi olduğu ifade edilmiştir. Ege bölgesinde Kaplan ve ark (2022a) tarafından yapılan bir çalışmada ise denizde faaliyet gösteren bir işletmede (kuluçkahane) çipuralarda PCR ile betanodavirus viral genom varlığı tespit edilmiş olup, yapılan filogenetik analiz sonucunda virusun reasortant RGNNV/SJNNV genotipi olduğu belirtilmiştir. Kaplan ve ark (2023) tarafından yapılan başka bir çalışmada, Akdeniz kıyısının farklı lokasyonlarından (Antalya, Mersin, Adana ve Hatay), toplam 400 balık (27 farklı balık türü) örneklenmiş olup, bunlardan barbun (*Mullus barbatus*) ve zargana (*Belone belone*) balıklarında sırasıyla RGNNV ve RGNNV/SJNNV genotipinin tespit edildiği bildirilmiştir. Kaplan ve ark (2022b) tarafından yapılan bir çalışmada, Kuzey Ege ve Marmara bölgelerinde doğal yataklarda bulunan kum midyesi (*Ruditapes decussatus*) ve kara midye (*Mytilus galloprovincialis*)’de betanodavirus varlığı tespit edilmemiştir. Oğuz ve ark (2023) tarafından yapılan bir çalışmada ise tatlı su türlerinden, japon (*Carassius auratus*) ve koi (*Cyprinus carpio*) balıklarında betanodavirus tespit edilmediğini ifade etmişlerdir.

### 1.2.6. Prevalans Durumu

Betanodavirusların prevalansına yönelik daha fazla çalışma yapılması gerektiği ifade edilmektedir (WOAH 2019, Kaplan ve Karaoğlu 2021). Çin ve Japonya’da 2012-2015 yılları arasında deniz kabukluları (İstiridye, midye) üzerinde yapılan çalışmada betanodavirus prevalansının Çin ve Japonya’da sırasıyla % 38.4 ve % 34.4 olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark 2018). Yunanistan’da Ege denizinden temin edilen 1580 balığın 55’inde betanodavirus viral genomu tespit edilmiş ve prevalansın % 17.09 olduğu ifade edilmiştir (Bitchava ve ark 2019). İspanya’nın Atlantik kıyı şeridinde 16 farklı türden toplam 1277 balığın 22’sinde betanodavirus viral genomu tespit edilmiş ve prevalansın % 1.72 olduğu bildirilmiştir (Vázquez-Salgado ve ark 2023). Bandín ve Souto (2020)’nun yapmış olduğu çalışmaya göre; Asya ve Avrupa’da betanodavirus tespit edilen balıklarda virusun genotiplendirmesi yapılmış ve buna göre pozitif örneklerden % 86’sının RGNNV, % 5.5’inin SJNNV ve % 1,8’inin ise BFNNV genotipi olduğu bildirilmiştir.

Ülkemizde VNNV’nin tespitine yönelik birçok araştırma (Özkan Özyer ve ark 2014, Kalaycı ve ark 2016, Kaplan ve ark 2021, Kaplan ve ark 2022a, Kaplan ve ark 2023) yapılmıştır. Kaplan ve Karaoğlu (2021) 2016-2017 yılları arasında ticari levrek kuluçkahaneleri ve çiftliklerden balıkların farklı gelişim dönemlerini (larva, fingerling ve juvenil) de kapsayan numuneler olarak betanodavirus varlığına yönelik bir çalışma yapmışlardır. Araştırma (2021) sonucunda kuluçkahane ve çiftliklerde betanodavirus prevalansının kuluçkahanelerde % 5, çiftliklerde ise % 6.25 oranında belirlendiği ifade edilmiştir.

### 1.2.7. Persistanlık Durumu

Balık yetiştiriciliğinde persiste enfekte balıkların varlığı, sürdürülebilir bir yetiştiricilik açısından ciddi bir tehdittir (Toffan ve Panzarin 2020). Yapılan araştırmalarda (Panzarin ve ark 2010, Toffan ve Panzarin 2020, Biasini ve ark 2022), klinik olarak hastalığı atlatan balıklarda virusun uzun bir dönem persiste olarak kalabileceği ve ortamda bulunan diğer balıklar için enfeksiyon kaynağı olabileceği belirtilmiştir (Toubanaki ve ark 2023). Johansen ve ark (2002) Norveç’te daha önce VNN hastalık geçmişi olan bir işletmede 4, 5 ve 8 aylık tamamen sağlıklı görünümdeki atlantik halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) yavrularında yapmış oldukları

araştırmada; betanodavirus varlığını histopatoloji, immunohistokimya (IHC-Immunohistochemistry) ve RT-PCR ile belirlediklerini ifade etmişlerdir. Araştırma (2002) sonucunda, bulaşmanın daha önce betanodavirus pozitif olan anaç balıklardan vertikal yolla yavrulara bulaşmış olabileceği ileri sürülmüştür. Johansen ve ark (2003)'nın betanodaviruslara duyarlı olan benekli kurt (*Anarhichas minor*) balıklarında yaptıkları bir çalışmada deneysel olarak enfeksiyon oluşturulmuş ve enfeksiyondan 4-8 hafta sonra histopatoloji, IHC ve RT-PCR ile araştırma yapmışlardır. Araştırmada (2003) 8. haftanın sonunda mortalite oranı % 52 olarak belirlenmiştir. Çalışmada (2003) klinik belirti göstermeyen hayatta kalan balıklarda 16 hafta sonra tekrar araştırma yapılmış ve PCR ile betanodavirus genom varlığı ortaya konulmuştur (Johansen ve ark 2003).

Betanodavirus enfeksiyonlarında asemptomatik enfekte balıkların aynı ortamda bulunan sağlıklı balıklar için daima tehdit olabileceği ifade edilmektedir (Biasini ve ark 2022). Toubanaki ve ark (2023) yaptıkları deneysel bir çalışmada, 28 gün boyunca levreklerde enfeksiyonun etkilerini günlük olarak takip etmişlerdir. Araştırmada (2023) enjeksiyonu takip eden 12. günde mortalite oranının % 83'e ulaştığı ve son 16 günde ise yüksek viral yüke rağmen mortalite oranının oldukça azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmada (2023), son 16 günde mortalite oranı azalmış olsa bile enfeksiyonun başından itibaren yüksek viral yüke sahip hayatta kalan balıkların asemptomatik virus taşıyıcısı olabileceği ileri sürülmüştür (Toubanaki ve ark 2023).

### **1.3. Patogenez**

Viral nervöz nekrozis virusunun organizmaya ağız, yüzgeç, solungaç ve bağırsak epitelleri vasıtasıyla girdiği ifade edilmektedir (Grotmol ve ark 1997, Johansen ve ark 2004, Souto ve ark 2018). Virusun sinir dokularının aksonları boyunca her iki yöne de taşınabileceği ve sinaptik yarıklardan geçerek sinirler arasında iletilebileceği bildirilmiştir (Ikenaga ve ark 2002). Yapılan histopatolojik çalışmalara (Grotmol ve ark 1997, Mladineo 2003, Tanaka ve ark 2003, Zorriehzahra ve ark 2020) göre cerebellum, olfaktorik sinir hücreleri, talamus, medulla oblongata, preoptik bölge ve optik sinirler hücre sel vakuollerin oluştuğu bölgelerdir. Virusun nörotropotik bir etken olmasından dolayı, konakçı organizmasının nöronal dokularına yerleşerek hücre sel patolojiye neden olduğu ifade edilmektedir (Mori ve ark 1992, Johnstone ve ark 2022). Merkezi sinir sistemi (MSS)'ne ve retinal sinirlere yerleşen virus, sinirlerde

vakuolizasyon gibi dejeneratif bozukluklara sebep olarak hücrelerin görevini yerine getirmesine engel olmaktadır (Souto ve ark 2018, Souto ve ark 2019, Zorriehzahra ve ark 2020).

Ayrıca VNNV'nin sinir doku haricinde birçok doku ve organdan (solungaç, kalp, dalak, böbrek, karaciğer, mide, bağırsak ve gonad) da izole edildiği bildirilmiştir (Nguyen ve ark 1997, Mladineo 2003, Oliveira ve ark 2008, Korsnes ve ark 2009, Mazalet ve ark 2011, Kim ve ark 2018). Dil balığı, morina balığı ve orfoz türlerinden alınan kan örneklerinde de virusa ait viral genom varlığının RT-PCR ile tespit edildiği ifade edilmiştir (Korsnes ve ark 2009). Virusun, kanda tespit edilmesi solungaç, kalp, dalak, böbrek, karaciğer, mide, bağırsak ve gonadlar gibi nöronal olmayan doku ve organlara hematojen yolla yayıldığını ortaya koymaktadır (Souto ve ark 2018, Bandín ve Souto 2020). Ancak bu organların hepsinin periferik sinir ağları ile donatıldığı ve bu durumun virusun, kan haricinde periferik sinirler aracılığı ile de organlar arasında yayılabileceğini gösterdiği ifade edilmiştir (Bandín ve Souto 2020).

Souto ve ark (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, dil balıklarında RGNNV, SJNNV ve RGNNV/SJNNV'ye ait genom varlıklarının beyinde tespit edildiği bildirilmiştir. Çalışmada (2018), RGNNV/SJNNV ve SJNNV genotiplerine sahip virusların, sırasıyla 1. ve 2. günde, RGNNV'nin ise daha uzun sürede (3. günde) beyine ulaştığı ifade edilmiştir. Ayrıca RGNNV/SJNNV genotipine sahip viruslar, deri, ağız ve solungaçlardan, SJNNV sadece solungaçlardan, RGNNV ise tüm yolları kullanarak organizmaya giriş yapabilmektedir (Souto ve ark 2019). Virusun organizmaya girişte kullandığı yolların farklı genotipe sahip betanodaviruslarda değişkenlik göstermesinin su sıcaklığı ile ilgili olduğu ifade edilmektedir (Toffan ve ark 2016, Souto ve ark 2019). Enfeksiyonun patogenezinde su sıcaklığı ile mortalite oranı arasında güçlü bir bağlantı olduğu ve su sıcaklığı arttıkça mortalite oranının da yükseldiği ifade edilmektedir (Panzarin ve ark 2014, Bandín ve Souto 2020, Toffan ve ark 2021, Zrnčić ve ark 2022, Combe ve ark 2023). Combe ve ark (2023), balıklarda deneysel enfeksiyon oluşturulan 53 çalışmadan elde ettikleri verilere göre, VNN enfeksiyonlarında su sıcaklığındaki 1°C'lık artışın mortalite oranında % 2.18 ile 5.37 arasında artış gösterdiğini belirtmişlerdir.

#### 1.4. Klinik Semptomlar

Betanodavirusa duyarlı balıklar VNN salgınlarında, enfeksiyondan en fazla, bağışıklık sistemlerinin yeterince gelişmediği ve hastalıklara en duyarlı oldukları larval dönemlerde etkilenmektedir (Panzarin ve ark 2016, Zorriehzahra 2020, Zrnčić ve ark 2022). Balıklar, larval dönemde ya da döllenme esnasında virus ile enfekte oldukları zaman mortalite oranı %100'ü bulabilmektedir (Zorriehzahra 2020). Ayrıca balıklarda, erken gelişim dönemlerinde fazla ölüm görülse de yetişkinlerde yaşa, viral yüke, su sıcaklığına ve virustan etkilenen türe göre ölümlerin görüldüğü rapor edilmiştir (Costa ve Thompson 2016, Bandín ve Souto 2020).

Betanodavirus enfeksiyonlarında klinik belirtilerin gözlenmesi, teşhiste önemli ipuçları vermektedir (Yang ve ark 2022). Hassas balıklarda iştah kaybı, deri renginde kararma, abdominal distansiyon, mandibular bölgede hemoraji, exoftalmus, letarji, su yüzeyinde ya da suyun havuza giriş noktasında toplanma ve anormal yüzme davranışları klinik belirtiler arasında yer alır (Munday ve Nakai 1997, Munday ve ark 2002, Costa ve Thompson 2016, Souto ve ark 2018, Zrnčić ve ark 2022). Ayrıca enfeksiyondan etkilenen balıklarda kendi etrafında dönme, hızlı hareketler ve karın üstü pozisyonda yüzme gibi davranış bozukluklarının da yaygın olarak görülen klinik belirtiler arasında olduğu bildirilmiştir (Munday ve Nakai 1997, Souto ve ark 2018, Biasini ve ark 2022). Zorriehzahra (2020), enfekte balıkların görme ve motor kontrollerini kaybettikleri için, dönerek yüzme gibi anormal davranışlar sergilediklerini bildirmiştir. Ayrıca hava kesesi inflamasyonuna bağlı olarak balıkların, su içinde hareketlerini kontrol etme yetenekleri kaybolduğundan, karın üstü pozisyon alarak düzensiz bir yüzme bozukluğu gösterdikleri belirtilmiştir (Johansen ve ark 2004, Zorriehzahra 2020). Chaves Pozo ve ark (2021) dört farklı betanodavirus genotipi (RGNNV, SJNNV, BFNNV ve TPNNV) ile minekop yavrularında deneysel bir enfeksiyon oluşturarak virustan etkilenen balıklarda, klinik belirtilerin farklılığı ve ortaya çıkış zamanı üzerine araştırma yapmışlardır. Çalışmada (2021), kontrol grubundaki tüm balıklarda enfeksiyona spesifik klinik belirti ve ölüm izlenmezken; RGNNV-TPNNV, BFNNV ve SJNNV genotipleri ile enfekte edilen gruplardaki balıklarda, sırasıyla 3, 4 ve 7. günlerde ilk klinik belirtilerin gözlemlendiği belirtilmiştir. Ayrıca VNNV genotipleri ile enfekte edilen gruplardaki balıklarda sırasıyla 10, 13, 16 ve 18. günlerde ölümlerin başladığı ifade edilmiştir. Aynı çalışmada (2021), farklı genotipe sahip viruslar ile enfekte edilen gruplardaki

balıklarda, klinik belirtilerin farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Böylece RGNNV ile enfekte edilen gruptaki balıkların dik yüzme hareketi sergiledikleri, TPNNV ve BFNNV ile enfekte edilen gruptaki balıkların havuz dibinde hareketsiz bir şekilde ya da baş aşağı dik pozisyonda durdukları, SJNNV ile enfekte edilen gruptaki balıkların ise yan yatarak düzensiz yüzme hareketi gösterdikleri belirtilmiştir. Ayrıca mortalite oranlarının; RGNNV, TPNNV, SJNNV ve BFNNV genotiplerine sahip viruslar ile enfekte edilen gruplarda sırasıyla % 71, % 54, % 53 ve % 44 olarak tespit edildiği ifade edilmiştir. Fouzi ve Sakazamary (2023), VNNV'ye özgü klinik belirti (su yüzeyinde anormal yüzme bozuklukları, abdominal distansiyon) gösteren 14-28 günlük Asya levreği larvalarında yaptıkları histopatoloji çalışmasında, balıkların retina ve beyinlerinde vakuolizasyon odakları ve nekrotik sinir doku dejenerasyonlarının tespit edildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca çalışma (2023) kapsamında, larvaların beyin ve gözlerinde betanodavirus viral genom varlığının PCR ile doğrulandığı ifade edilmiştir.

Enfeksiyondan etkilenen balıkların nekropsisinde, beyin ve bağırsaklarda hemoraji, hava kesesinde kalınlaşma ile birlikte opasite artışı ve ayrıca görme bozukluğuna bağlı olarak kafa gölgesinde oluşan travmatik lezyonların da görüldüğü ifade edilmektedir (Costa ve Thompson 2016, Zorriehzakra 2020, Zrnčić ve ark 2022).

## **1.5. Teşhis**

Betanodavirus kaynaklı enfeksiyonlardan korunmak için etkenin doğru ve olabilecek en hızlı şekilde teşhis edilebilmesi gereklidir. Dünden bugüne etkenin ve oluşturduğu enfeksiyonun tanımlanmasında; klinik gözlemlerden, virusun hücre kültürlerinde izolasyonuna, histopatolojisine ve moleküler tanı yöntemlerine kadar birçok teşhis metodunun geliştirildiği bildirilmiştir (Bandín ve Souto 2020, Yang ve ark 2022).

### **1.5.1. Klinik Gözlem ve Davranış Değişiklikleri**

Klinik gözleme dayalı olarak hastalığın teşhisi bazı durumlarda yetersiz kalabilir (WOAH 2019, Bandín ve Souto 2020). Etkenin, balıklarda persiste enfeksiyonlara neden olduğu düşünüldüğünde, kesin teşhis için klinik bulguların laboratuvar tanı ile desteklenmesi gereklidir (Souto ve ark 2015). Enfekte balıkların yüzme hızlarında, motor kontrol faaliyetlerin bozulmasından dolayı düzensiz bir artış gözlemlendiği ifade edilmektedir (Munday ve ark 2002, Furusawa ve ark 2007,

Zorriehzahra 2020). Bu durum, özellikle üretim çiftliklerinde kısıtlı bir alanda yaşayan balıkların tank ve kafes duvarlarına çarpmalarına neden olmaktadır. Bunun sonucunda, balıklarda özellikle mandibular bölgede travmatik yaralar oluşabilmektedir (Maltese ve Bovo 2007, Zrnčić ve ark 2022).

### 1.5.2. Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu

Hücre kültürlerinde virus izolasyonu, viral bir etkenin kapsamlı çalışılmasında en temel araştırma basamağıdır (Bandín ve Souto 2020). European Collection of Cell Culture (ECACC)'e göre, VNNV'nin tanı ve izolasyonu için, Striped snakehead balıklarından köken alan SSN-1 ve SSN-1 hücrelerinden klonlanan E-11 hücre hatları kullanılmaktadır (WOAH 2019, Bandín ve Souto 2020, Zorriehzahra ve ark 2022). Ayrıca VNNV'nin izolasyonu için rainbow trout gonad (RTG-2), chinook salmon embriyo (CHSE-214), fathead minnow (FHM), blue gill fry (BF-2) ve epithelioma papulosum cyprini (EPC) gibi alabalık ve sazan balığı hücre hatları ile çalışmalar yapılmış, ancak başarılı sonuçlar alınmadığı bildirilmiştir (Iwamoto ve ark 2000, Bandín ve Souto 2020). Asya levreği (*Lates calcarifer*)'nden elde edilen barramundi brain (BB) ve grouper türü balıklar (*Epinephelus coioides*)'dan hazırlanan grouperfin (GF-1) hücre hatlarının da araştırmalarda kullanıldığı bildirilmiştir (Chi ve ark 1999, Chi ve ark 2005, Bandín ve Souto 2020). Yapılan çalışmalarda, BB ve GF-1 hücre hatlarına inokule edilen virusun hücrelerde yeterince proliferasyon gösterdiği ve sonuçların başarılı olduğu bildirilmiştir (Chi ve ark 1999, Chi ve ark 2005). Avrupa deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*)'nden elde edilen DLB-1, çipura (*Sparus aurata*)'dan elde edilen SaB-1 ve çipura yüzgeçlerinden elde edilen SAF-1 hücre hatları da deneysel olarak araştırmalarda kullanılmıştır (Bandín ve Souto 2020, Valero ve ark 2021). Valero ve ark (2021) RGNNV, SJNNV ve RGNNV/SJNNV reassortant genotipe sahip virus suşlarını farklı hücre hatlarına (E-11, GF-1, SAF-1, DLB-1 ve SaB-1) inokule ederek, adsorbsiyon verimliliklerini karşılaştırmışlardır. Çalışmada (2021), ortalama adsorbsiyon verimliliği yönünden, E-11 (% 90), DLB-1 (% 90), SAF-1 (% 88) ve GF-1 (% 50) hücre hatlarını yüksek, SaB-1 (% 20)'i ise düşük duyarlı olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Kaplan ve Karaoğlu (2021), RT-qPCR ile betanodavirus genom varlığını belirledikleri örnekleri ilk önce E-11 hücresine inokule ettiklerini ve hücrelerde herhangi bir CPE gözlemediklerini bildirmişlerdir. Takiben aynı örnekleri SSN-1 hücre kültürüne inokule etmişler ve 4. günün sonunda hücrelerde vakuolizasyon ve lizisten oluşan CPE'ler gözlemediklerini ifade

etmişlerdir.

Betanodavirusların teşhisinde, hücre kültürlerinde virus izolasyonu ‘‘Gold Standart’’ olarak kabul edilse bile (Zorriehzahra ve ark 2022); teşhis sürecinin uzaması ve viral yükü düşük olan örneklerde yanlış negatifliklerin elde edilebilmesi gibi nedenlerle, moleküler teknikler kullanılarak tanıya gidilmesi önerilmektedir (Doan ve ark 2017, WOAHA 2019, Bandín ve Souto 2020, Zorriehzahra ve ark 2022). Ayrıca betanodavirus sörveyans çalışmalarında, RT-qPCR ile pozitif sonuç belirlenmesi durumunda, hücre kültüründe virus izolasyonu yapılması teşhis için uygun bir yöntem olarak bildirilmektedir (WOAHA 2019, Bandín ve Souto 2020, Yang ve ark 2022, Zorriehzahra ve ark 2022).

### **1.5.3. Moleküler Tanı Yöntemleri**

Moleküler metotlar, diğer teşhis yöntemlerine göre, virusun çok düşük titrelerde bile tespitini sağlaması açısından güvenilir bir tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir (Panzarin ve ark 2010, WOAHA 2019, Bandín ve Souto 2020). Virusun tanısında, yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip PCR temelli yöntemler, hızlı sonuç vermeleri ile tercih edilerek kullanılırlar (Dalla Valle ve ark 2005, Panzarin ve ark 2010, WOAHA 2019, Bandín ve Souto 2020).

Virusun genomik segmentlerini (RNA1 ve RNA2) hedefleyen, PCR temelli çok sayıda metot geliştirilmiştir (Nishizawa ve ark 1994, Panzarin ve ark 2010, Bandín ve Souto 2020). Virusun moleküler olarak ilk kez teşhisinin, RNA2 genini hedefleyen konvansiyonel RT-PCR ile yapıldığı bildirilmiştir (Nishizawa ve ark 1994, Nishizawa ve ark 1996). Dalla Valle ve ark (2005), yaptıkları deneysel bir çalışmada, virusun RNA1 ve RNA2 genini ekstrakte ettiklerini ve enfeksiyonun 3. gününden 14. güne kadar günlük ölçümlerde, RNA2 geninin kopya sayısını, RNA1 genine göre daha yüksek seviyelerde tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca WOAHA, yayınladığı raporda (Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals - 2019), ulusal referans kuruluşlarca yürütölen rutin teşhis çalışmalarında, virusun RNA2 geninin hedeflendiği RT-qPCR metodunun daha uygun olduğunu belirtmiştir (Yang ve ark 2022).

RT-qPCR, konvansiyonel PCR’a göre daha duyarlı, hızlı ve güvenilir sonuçlar vermektedir (WOAHA 2019, Bandín ve Souto 2020). Bu sebeple RT-qPCR’ın hücre kültürü veya konvansiyonel PCR gibi diğer teşhis metotlarından daha uygun olduğu

ifade edilmektedir (Dalla Valle ve ark 2005, Hick ve ark 2011a, Panzarin ve ark 2010, Bandín ve Souto 2020). Betanodavirusların, RT-qPCR ile teşhis edildiği birçok çalışma (Dalla Valle ve ark 2005, Grove ve ark 2006, Hick ve Whittington 2010, Panzarin ve ark 2010) mevcuttur. Grove ve ark (2006), betanodavirusların Atlantik halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) balıklarında belirlenebilmesi için spesifik bir RT-qPCR metodu geliştirmişlerdir. Ancak WOAH (2019) geliştirilen bu metodun (2006), soğuk su balıklarında enfeksiyona neden olan betanodavirus genotiplerinin (BFNNV, AHNNV) teşhisi için uygun olduğunu, ılıman su balıklarında enfeksiyona neden olan genotiplerin (RGNNV, SJNNV) teşhisi için ise yetersiz olduğunu bildirmiştir. Hick ve Whittington (2010), betanodavirusların tespiti için kapsamlı bir şekilde validasyonu yapılmış RT-qPCR'ı optimize ettiklerini ifade etmişlerdir. Analitik duyarlılığı, diyagnostik sensitiviteyi ve tekrarlanabilirliği değerlendirdikleri çalışmanın sonunda, olumlu veriler elde ettiklerini bildirmişlerdir. Ancak WOAH (2019), geliştirilen bu metodun (2010), ılıman su balıklarında enfeksiyona neden olan RGNNV genotipinin teşhisi için etkisiz olduğunu bildirmiştir. Panzarin ve ark (2010), Asya ve Avrupa ülkelerinde tespit edilen farklı genotipe sahip izolatları kullanarak, bir RT-qPCR metodu geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Bu metod ile hem soğuk hem de ılıman sularda enfeksiyona neden olan genotiplerin tamamının (RGNNV, SJNNV, BFNNV ve TPNNV) tespit edilebildiği ifade edilmiştir (WOAH 2019).

WOAH (2019) tarafından, Panzarin ve ark (2010)'nın geliştirdiği RT-qPCR metodunun, uluslararası VNN referans laboratuvarı standartlarına göre valide edildiği ve bilinen dört betanodavirus genotipi (RGNNV, SJNNV, BFNNV, TPNNV)'nin tespiti için de uygun olduğu bildirilmiştir.

Enfekte balıkların yaş dönemlerine göre, betanodavirusların tespitinde tercih edilerek kullanılan farklı teşhis metotları ve karşılaştırmaları Tablo 1.4'de verilmiştir (WOAH 2019). Betanodavirusların RNA1 ve RNA2 geninin hedeflendiği araştırma çalışmalarında (Dalla Valle ve ark 2005, Grove ve ark 2006, Hick ve Whittington 2010, Panzarin ve ark 2010) kullanılan primer ve prob setleri ise Tablo 1.5'de verilmiştir. Ayrıca betanodavirus sörveyans çalışmalarında, etkenin RT-qPCR ile tespitinin ardından hücre kültürlerinde izolasyonunun ve sekans analizinin yapılması da önerilmektedir (WOAH 2019).

**Tablo 1.4.** Betanodavirusların tespitinde kullanılan tanı metotları ve karşılaştırılmaları (WOAH 2019).

Uygulanan Metot	Hedeflenen Boyut			Varsayımsal Tanı	Doğrulatoryıcı Tanı
	Larva	Juvenil	Yetişkin		
Histopatoloji	D	D	D	B	D
Histopatoloji takiben İmmun Boyama	D	D	D	B	D
Transmisyon EM	D	D	D	C	D
Hücre kültürlerinde izolasyonu takiben İmmun Boyama ya da PCR	A	A	D	A	A
RT-PCR	B	B	B	A	A
RT-PCR takiben Sekanslama	D	D	D	B	A
RT-qPCR	A	A	A	A	A

- A. Teşhis özgüllüğü ve duyarlılığı nedeniyle yöntem, fayda ve uygunluk açısından önerilen metot.  
 B. Teşhis özgüllüğü ve duyarlılık bakımından standart bir metot.  
 C. Maliyet ve zaman gibi faktörler bakımından sıklıkla kullanılmayan metot.  
 D. Günümüzde tavsiye edilmeyen bir metot.

**Tablo 1.5.** Betanodavirusların RT-qPCR ile teşhisinde kullanılan primer ve prob setleri (WOAH 2019).

Primer	Hedef Genom	5'- 3' Sekans	Amplikon Boyutu (bp)	Referans
Q-RdRP-1 Q-RdRP-2	RNA1	GTG-TCC-GGA-GAG-GTT-AAG-GAT-G CTT-GAA-TTG-ATC-AAC-GGT-GAA-CA	273	Dalle Valle ve ark 2005
Q-CP-1 Q-CP-2	RNA2	CAA-CTG-ACA-ACG-ATC-ACA-CCT-TC CAA-TCG-AAC-ACT-CCA-GCG-ACA	230	Dalle Valle ve ark 2005
P1 P2 Probe	RNA2	GGT-ATG-TCG-AGA-ATC-GCC-C TAA-CCA-CCG-CCC-GTG-TT TTA-TCC-CAG-CTG-GCA-CCG-GC	194	Grove ve ark 2006
qR2TF qR2TR R2probe2	RNA2	CTT-CCT-GCC-TGA-TCC-AAC-TG GTT-CTG-CTT-TCC-CAC-CAT-TTG CAA-CGA-CTG-CAC-CAC-GAG-TTG	93	Hick ve Whittington 2010
RNA2 FOR RNA2 REV RNA2 probe	RNA2	CAA-CTG-ACA-RCG-AHC-ACA-C CCC-ACC-AYT-TGG-CVA-C TYC-ARG-CRA-CTC-GTG-GTG-CVG	69	Panzarin ve ark 2010

#### 1.5.4. Serolojik Tanı Yöntemleri

Serolojik tanı, etkene veya antijenlerine karşı canlıda oluşan antikorların tespitinde çok eskiden beri kullanılan bir yöntemdir (Arimoto ve ark 1992, Gye ve Nishizawa 2018, Tarrab ve ark 2019, Bandín ve Souto 2020). Serolojik tanıda Enzyme

Linked Immunosorbent Assay (ELISA), antijene karşı antikor ya da antikora karşı antijen tespitinde kullanılan bir tanı metodudur (Gye ve Nishizawa 2018). Arimoto ve ark (1992), 1991-1992 yılları arasında Japonya'da Kral balığı anaçlarından aldıkları kan örneklerinde, Indirekt ELISA ile betanodavirusa spesifik antikorların varlığını tespit etmişlerdir. Tarrab ve ark (2019), deneysel bir çalışma ile levrek ve lahoz balıklarında betanodavirusa spesifik antikorların varlığını Indirekt ELISA ile ortaya koyduklarını bildirmişlerdir. Yıllar içinde betanodavirusları ve buna karşı oluşan antikorları tespit etmek amacıyla farklı ELISA protokollerinin geliştirildiği bildirilmiştir (Watanabe ve ark 2000, Tarrab ve ark 2019, Bandín ve Souto, 2020). Ancak virus ile antikorlar arasındaki spesifik olmayan reaksiyonlardan kaynaklı düşük bağlanma ve yüksek optik dansite (OD) değerlerinin, antikorların tespitini zorlaştırdığı ifade edilmiştir (Gye ve Nishizawa 2018). Bu durumun üstesinden gelebilmek için Gye ve Nishizawa (2018), betanodavirusa spesifik IgM'lerin belirlenmesinde immobilize balık serumu kullanarak bir Sandwich ELISA metodu geliştirdiklerini bildirmişlerdir.

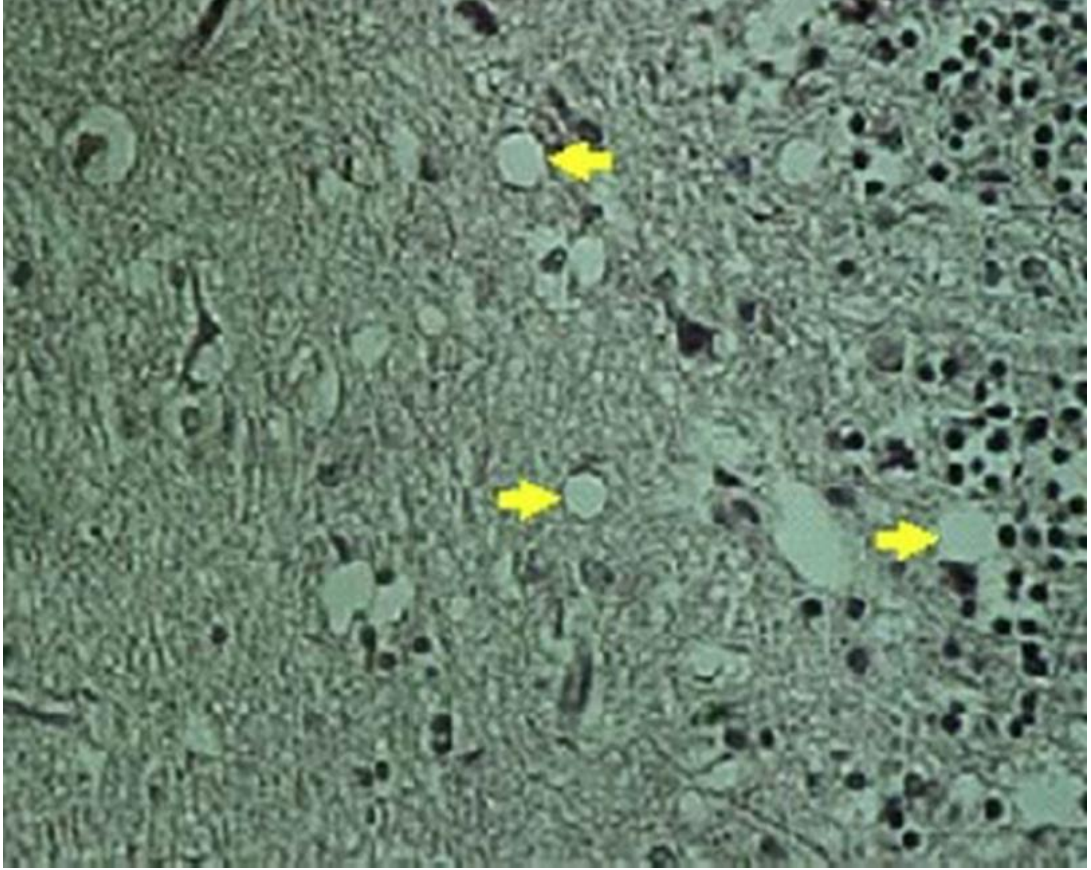
ELISA ile balığa zarar vermeden kan örneklerinde, etkene veya antijenlerine karşı oluşan spesifik antikorların varlığının araştırıldığı bildirilmektedir (Watanabe ve ark 2000, Tarrab ve ark 2019, Bandín ve Souto 2020). Tarrab ve ark (2019), deneysel bir enfeksiyonla levreklerde betanodavirusa karşı oluşan antikorların varlığını Indirekt ELISA ile araştırdıklarını bildirmişlerdir. Çalışmada (2019), enfeksiyondan 5 gün sonra alınan kan örneklerinde, betanodavirusa spesifik IgM'lerin tespit edildiği, 15. günde önemli bir artış gözlemlendiği ve ayrıca 180. güne kadar kanda IgM'lerin belirlenebildiği ifade edilmiştir.

### **1.5.5. Histopatoloji**

Yapılan çalışmalarda (Munday ve ark 1992, Grotmol 1995, Munday ve Nakai 1997, Low ve ark 2017) virusun beyin, medulla spinalis ve göz gibi organlarda yer alan sinir hücrelerinde, vakuolizasyon ile sonuçlanan patolojik bozukluklara neden olduğu bildirilmiştir (Doan ve ark 2017, Bandín ve Souto 2020, Zrnčić ve ark 2022).

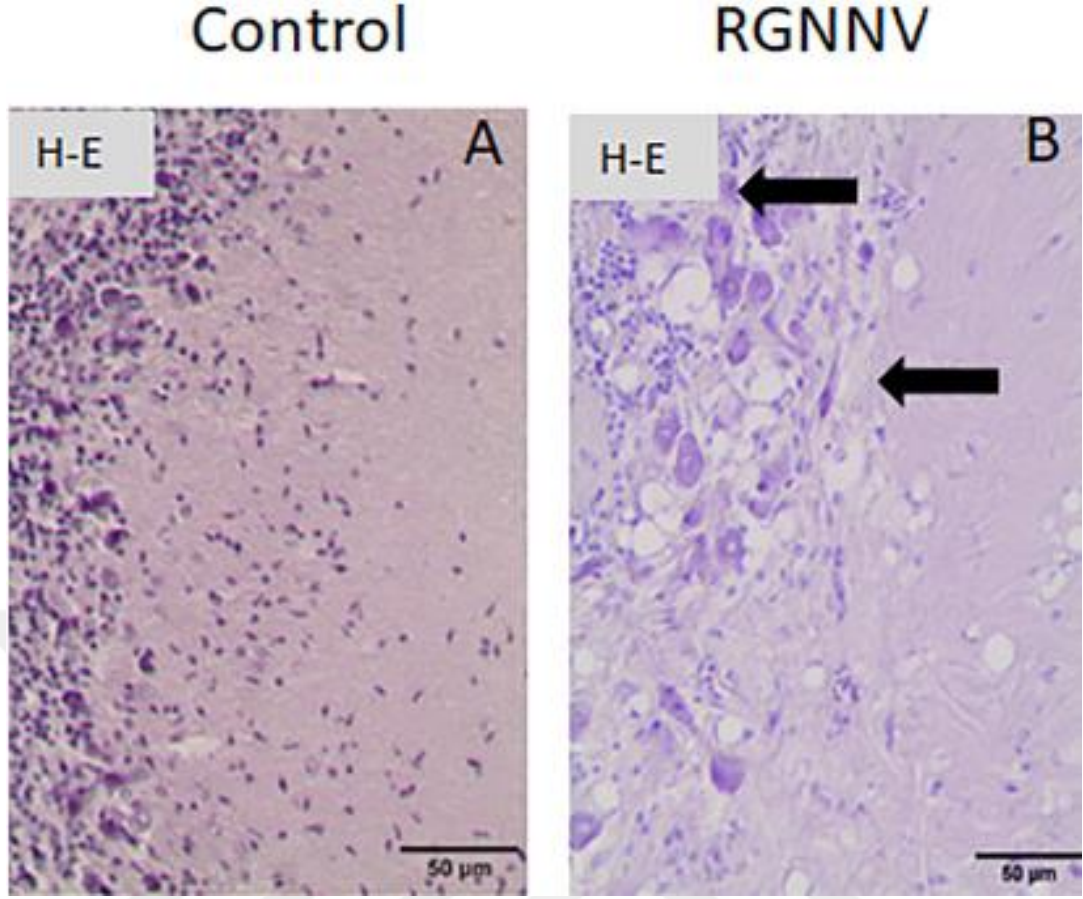
Enfeksiyon sonucunda, yetişkinlere oranla larval ve juvenil dönemdeki balıklarda MSS hücrelerinde vakuolizasyonun daha çok gözlemlendiği ifade edilmiştir. (Munday ve Nakai 1997, Mladineo 2003, Ghasemi ve ark 2013). Zorriehzahra ve ark (2014), Hazar Denizi'nden örnekledikleri sağlıklı görünümdeki balıklarda,

betanodavirus genom varlığını PCR ile tespit etmişlerdir. Çalışma (2014) sonucunda, altınbaş kefal (*Liza auratus*) türü balıkların beyin ve optik sinirlerinde, enfeksiyon nedeniyle oluşan geniş vakuolizasyon alanlarının (Şekil 1.4) tespit edildiği bildirilmiştir.



**Şekil 1.4.** Hazar Denizi'nden örneklenen Altınbaş Kefal (*Liza auratus*) türü balıklarda betanodavirus kaynaklı beyinde vakuolizasyon görüntüsü (sarı oklar) (Zorriehzahra ve ark 2014).

Chaves Pozo ve ark (2021), kültürü yapılan minekop (*Umbrina cirrosa*) yavrularını betanodavirus ile deneysel olarak enfekte etmişler, takiben virusun hücrelerde meydana getirdiği değişiklikleri histopatolojik olarak incelediklerini bildirmişlerdir. Çalışma (2021) sonunda, enfeksiyondan 3 gün sonra balıklarda betanodavirusa özgü klinik semptomların gözlemlendiği ve 8. günde enfekte balıkların beyin hücrelerinin histopatolojisinde vakuolizasyon odaklarının belirlendiği bildirilmiştir (Şekil 1.5).



**Şekil 1.5.** Deneysel betanodavirus enfeksiyonu sonucunda, minekop (*Umbrina cirrosa*) yavrularının beyinde oluşan vakuolizasyon alanları. A. Kontrol, B. Vakuolizasyon alanları (siyah oklar) (Chaves Pozo ve ark 2021).

### 1.5.6. Örneklem Planı ve Hedef Organ Seçimi

Viral teşhis çalışmalarında, örnekleme yapılacak olan yerin seçiminden örneklenecek numunenin miktarına kadar, birçok parametre bulunmaktadır (WOAH 2019). Örneklenen balıkların fiziksel durumu (morfolojisi), yaşı, klinik belirti gösterip göstermediği ve alınan anamnez teşhis için önemlidir (Bandín ve Souto 2020). WOA (2019), klinik belirti gösteren balıkların 5-10 tanesinden alınan organların birleştirilerek bir örnek olarak kabul edilmesini, asemptomatik olan balıkların ise bireysel olarak test edilmesi gerektiğini bildirmektedir. Ayrıca VNNV'nin teşhisinde, numune seçimi için önceliğin yeni ölmüş ya da ölmek üzere olan letarjik balıklardan olması gerektiği ifade edilmektedir (WOAH 2019).

Nörotropik bir etken olan betanodavirusların teşhisinde, balığın hedeflenen organlarının öncelikli olarak göz ve beyin olması gerektiği bildirilmektedir (Dalla Valle ve ark 2000, WOA 2019, Bandín ve Souto 2020). Ayrıca gonadal biyopsi

örnekleri, seminal sıvı ve yumurtalardan da örnekleme yapılabileceği belirtilmektedir (Doan ve ark 2017, Ahmad ve ark 2019). Bazı viral balık hastalıklarının teşhisinde böbrek, kalp, karaciğer ve dalak gibi organların da alınması önerilirken, betanodaviruslar için ise beyin ve göz dışındaki organların tanı materyali olarak alınması tavsiye edilmemektedir (WOAH 2019). Betanodavirusların teşhisinde örneklenen balıkların boylarının önemli olduğu bildirilmiştir (WOAH 2019). Erken gelişim çağındaki larval dönem balıklarında (1 santimetre (cm) ve altında) hastalıktan şüphelenildiğinde, balıkların bütün olarak incelenmesi tavsiye edilmektedir. Balık boyunun 1 - 6 cm arasında olduğu durumlarda, operkulum hizasından itibaren tüm kafa bölgesinin alınması yeterli görülürken, 6 cm'den daha büyük olanlarda ise sadece göz ve beyinlerin alınması önerilmektedir (WOAH 2019). Ayrıca laboratuvara teşhis amacıyla gönderilen balıkların analize başlanmadan önce, 4 °C'da 2-3 gün arasında, -20 °C ya da -80 °C'da 2-3 haftaya kadar saklanabileceği bildirilmiştir (WOAH 2019).

#### **1.6. Koruma ve Kontrol**

Betanodaviruslar kuluçkahanelerde kontamine su, alet-ekipman ve enfekte balıklar vasıtasıyla kolaylıkla yayılabilir (Vázquez-Salgado ve ark 2020, Padrós ve ark 2022). Bu nedenle yetiştirme tesislerinde enfeksiyondan korunma amacıyla biyogüvenlik önlemlerinin alınması önem arz etmektedir. Ayrıca etkili bir korunma için balık taşımada kullanılan ekipmanların ve havuz sularının da dezenfekte edilmesi önem taşımaktadır (Volpe ve ark 2020, Padrós ve ark 2022). Virus bulaşında; çalışan personelin, havuz diplerinde kalan yem kaynaklı organik atıkların, işletmeye dışarıdan kontrolsüz alınan damızlık balıkların, yumurtaların ve larval dönemde beslemede kullanılan rotifer, artemia gibi virus rezarvuarı olabilen canlı yemlerin büyük önemi vardır (Vázquez-Salgado ve ark 2020, Padrós ve ark 2022). Ayrıca damızlıkların beslenmesinde kullanılan canlı veya dondurulmuş balıkların analizi yapılmadan kullanımından kaçınılması gerektiği de bildirilmektedir (Hick ve ark 2011, Vázquez-Salgado ve ark 2020, Padrós ve ark 2022).

Virusun vertikal yolla bulaşma riskini en aza indirmek için, VNNV ari damızlık seçiminin önemli olduğu ifade edilmektedir (Mushiake ve ark 1994, Doan ve ark 2017, Ahmad ve ark 2019). Başka bir işletmeden kuluçkahaneye gelecek olan damızlık balıkların, tesiste bulunan diğer gruplardan belirli bir süre izole edilmesi ve havuzlar arası ekipman paylaşımının yapılmaması gerektiği bildirilmektedir (Padrós ve ark

2022). İşletmede kullanılan ekipmanların bölümlerini gösterecek şekilde numaralandırarak dezenfeksiyon havuzlarında tutulması önem arz etmektedir. Ayrıca balıkların düzenli olarak laboratuvarında betanodavirus genom varlığı yönünden incelenmesi ve çıkacak sonuca göre önlemlerin alınması gerektiği ifade edilmektedir (Padrós ve ark 2022).

### **1.6.1. Dezenfeksiyon Önlemleri**

Betanodavirus kaynaklı salgınlarda, işletmenin kuluçkahane ve yetiştirme havuzlarının bulunduğu bölümlerinde uygulanacak olan dezenfeksiyon önemli bir tedbirdir. Alınacak biyogüvenlik önlemleri, işletmede bulunan malzemelerin dezenfeksiyonundan, anaç balıklardan yumurtaların elde edildiği döneme kadar titizlikle gerçekleştirilmelidir (Padrós ve ark 2022). Virusun yıkıcı etkisi daha çok balıkların yumurta ve larvaları üzerinde olduğundan, bu dönemde alınacak tedbirlerin en üst düzeye çıkarılması gerektiği ifade edilmektedir (Vázquez-Salgado ve ark 2020, Padrós ve ark 2022).

İşletmede kullanılacak suyun dezenfeksiyonunun sağlanması, VNNV'nin görülme oranını düşürdüğü bildirilmektedir (Arimoto ve ark 1996, Toffan ve ark 2017, Vázquez-Salgado ve ark 2020, Padrós ve ark 2022). Virusun suda inaktivasyonunda; sodyum hipoklorit, ultraviyole (UV) sistemleri, iyotlu bileşiklerin ve ozon (O<sub>3</sub>) uygulanması ile başarılı sonuçların elde edilebildiği ancak formalin, etanol ve kloroformun daha az etkili olduğu ifade edilmiştir (Liltved ve ark 2006, Nakai ve ark 2009, Costa ve Thompson 2016).

Yetiştirme tankları için tedarik edilen suyun, organik ve inorganik kirlilik bakımından filtre edildikten sonra, UV sistemlerinden geçirilmesinin bulaşıcılığı büyük oranda azalttığı belirtilmiştir (Liltved ve ark 2006, Padrós ve ark 2022). UV ile virus inaktivasyonunda, virusun yapısına göre farklı doz aralıkları bildirilmiştir (WHO 2017, Padrós ve ark 2022). Adenoviruslar gibi büyük boyuta sahip DNA viruslarında 200 mWs (miliwat saniye) / santimetre kare (cm<sup>2</sup>) yeterli iken, picornaviruslarda ise 20-30 mWs/cm<sup>2</sup>'nin yeterli olduğu ifade edilmiştir (Padrós ve ark 2022). Betanodavirusların inaktivasyonu için ise bu aralığın, 100-300 mWs/cm<sup>2</sup> olması gerektiği bildirilmiştir (Arimoto ve ark 1999, Frerichs ve ark 2000, Falco ve ark 2021, Padrós ve ark 2022).

Grotmol ve Totland (2000), balık yumurta ve larvalarında etkili dozları belirlemek için, 0,3-10 mg/L ve 0,5-10 dakika aralığında O<sub>3</sub> uygulaması ile bir deneme çalışması yapmışlardır. Araştırma (2000)'da, 0,5-1 dakika süre ile 4 mg/L O<sub>3</sub> uygulamasının betanodavirus inaktivasyonunda etkili olduğu ve kuluçkahane şartlarında yumurta ve larvalar üzerinde herhangi bir yan etki gözlenmediği bildirilmiştir. Ayrıca tesiste dezenfeksiyon amacıyla kurulan bu sistemlerin (UV, O<sub>3</sub>) rutin olarak çalışıp çalışmadığının da düzenli olarak kontrol edilmesi gerektiği ifade edilmektedir (Padrós ve ark 2022). Betanodavirus kaynaklı bir salgında, ölü balıkların ortamdaki uzaklaştırılması ve kontamine havuz suyunun dezenfekte edilerek bertaraf edilmesi gerektiği ifade edilmektedir (Padrós ve ark 2022).

### **1.6.2. Aşılama**

Viral nervöz nekrozis virus enfeksiyonlarından korunma yollarından bir tanesi de balıklara aşı uygulanarak bağışıklık sağlanmasıdır (Costa ve Thompson 2016, Valero ve ark 2021). Betanodavirus enfeksiyonlarına karşı birçok aşı çalışması (Kai ve Chi 2008, Pakingking ve ark 2010, Chen ve ark 2011, Buonocore ve ark 2019, Barsøe ve ark 2021a) yapılmıştır. Denemesi yapılan bu aşuların, hastalık insidansını ve balık ölümlerini etkili bir şekilde azalttığı ifade edilmiştir (Costa ve Thompson 2016, Doan ve ark 2017, Bandín ve Souto 2020, Barsøe ve ark 2021a). Betanodavirus enfeksiyonuna bağlı ölümlerin özellikle balıkların larval ve juvenil dönemlerinde görüldüğü bildirilmektedir (Mori ve ark 1992, Munday ve ark 2002, Peruzza ve ark 2021). Larval dönemde, balıkların bağışıklık sistemlerinin yeterince gelişmemiş olmasından dolayı enfeksiyondan daha fazla etkilendikleri ifade edilmiştir (Costa ve Thompson 2016, WOA 2019).

Balıklarda aşular genellikle enjeksiyon, banyo veya oral yolla uygulanmaktadır. Enjeksiyon ve banyo yoluyla uygulanan aşılama yöntemlerinin dünyada yaygın olarak kullanıldığı ifade edilmektedir (Wang ve ark 2020). Enjeksiyon ile vücuda intraperitoneal (IP) ve intramuskuler (IM) olarak aşı uygulaması yapılmaktadır. Oral yolla aşı uygulaması ise, balıkları beslemede kullanılan yemlere aşının kapsüle edilerek verilmesi ile yapılır. En yaygın olarak kullanılan aşılama yöntemi ise banyo ile aşı uygulamalarıdır. Bu yöntemle aşılanacak balıklar, suyuna aşı ilave edilmiş havuzlarda belirli bir süre tutulurlar. Her uygulama yolunun avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır (Wang ve ark 2020). Her bir balığa doğru miktarda aşı

uygulanabilmesi, düşük dozlarda antijen varlığının yeterli olması, farklı aşuların bir arada kullanılabilmesi ve güçlü sistemik etkisinden dolayı enjeksiyon ile aşı uygulamalarının avantajlı olduğu kabul edilmektedir (Sommerset ve ark 2005, Plant ve LaPatra 2011, Wang ve ark 2020). Ancak aşılacak balıklara anestezi uygulanması, elle manipölasyon gerektirmesi, enjeksiyon sonrası ortaya çıkabilecek komplikasyonlar gibi stres oluşturabilen faktörler ise enjeksiyon yolu ile aşı uygulamalarının dezavantajları olarak ifade edilmektedir (Sharpe 2007, Wang ve ark 2020). Ayrıca enjeksiyonla aşılama, balıkların belirli bir büyüklüğün ve ağırlığın üzerinde olmasını gerektirmektedir. Bu uygulama zorunluluğunun, hastalığa duyarlı olan yavru balıkların bu yol ile aşılmasını zorlaştırdığı ifade edilmektedir (Sharpe 2007, Wang ve ark 2020). Aşı kapsülleri içeren yemlerin, havuzlarda bulunan balıklara eşit olarak dağıtılamayacağı ve yeme ilgisiz kalan balıklarda bu nedenle bağışıklığın sağlanamayacak olması da oral yolla aşılamanın dezavantajları arasında yer almaktadır (Maurice ve ark 2004, Wang ve ark 2020).

Betanodavirus enfeksiyonlarına karşı virusun canlı ya da inaktif hale getirilmesiyle, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak ve virus benzeri parçacık (Virus like particles-VLP's)'lar olarak tanımlanan farklı aşı hazırlama yöntemlerinin araştırıldığı birçok çalışma (Lin ve ark 2007, Kai ve Chi 2008, Pakingking ve ark 2010, Chen ve ark 2011, Vimal ve ark 2014, Buonocore ve ark 2019, Barsøe ve ark 2021a) yapılmıştır. Levrekler ile yapılan deneysel çalışmalarda (Yamashita ve ark 2009, Pakingking ve ark 2010, Buonocore ve ark 2019), balıklara uygulanan inaktif betanodavirus aşuları ile virusa spesifik nötralizan antikörlerin geliştiği ve etkili bir koruma sağlandığı ifade edilmiştir. Bazı Avrupa ülkelerinde (Fransa, İtalya, Yunanistan, İspanya ve Hırvatistan) levreklerde lisanslı iki inaktif betanodavirus aşısı (Icthiovac® VNN-Hipra, Alpha Ject®Micro 1 Noda-Zoetis)'nın kullanıldığı bildirilmiştir (Bandín ve Souto 2020, Valero ve ark 2021, Padrós ve ark 2022). Bu aşılardan Icthiovac® VNN-Hipra'nın, balıklarda 20 °C'da 46 günde bağışıklık sağladığı, Alpha Ject®Micro 1 Noda'nın ise balıklarda 20 °C'da 22-25 günde bağışıklık sağladığı tespit edilmiştir. Her iki aşının da 12-15 gr ve üzerinde vücut ağırlığına sahip juvenil boy levreklerle uygulandığı ifade edilmektedir (Padrós ve ark 2022). Kai ve Chi (2008), grouper (*Epinephelus coioides*) türü larval dönemdeki balıklarda immersiyon (suya daldırma) yolu ile aşılama kullanılmak üzere, Formalin (% 0.1-0.2) ve Etilamin (0.4 mM) ile inaktif hale getirilerek hazırladıkları

betanodavirus aşılarını kullanmışlar ve elde etikleri sonuçları karşılaştırmışlardır. Çalışma (2008) sonunda, Etilamin kullanılarak hazırlanan inaktif aşularla aşılanan balıklarda relatif hayatta kalma oranı (RPS)'nin %79-95 olduğu, formalin ile hazırlanan inaktif aşularla aşılanan balıklarda ise RPS'nin % 39-43 olarak tespit edildiği ifade edilmiştir.

*Vibrio anguillarum*, birçok balık (Atlantik somonu, alabalık, zebra vs.) türünden izole edilebilen bir bakteri türüdür. Bu bakteriye rekombinant viral kapsid proteininin eklenmesi ve bunun da artemia canlı yemine kapsüle edilmesiyle oral aşı hazırlama çalışmaları (Lin ve ark 2007, Rojo ve ark 2007, Chen ve ark 2011, Chen ve ark 2014) yapılmıştır. Chen ve ark (2011), betanodavirus kapsid proteinini ekledikleri *Vibrio anguillarum*'u *artemia nauplii* canlı yemine kapsüle etmişler ve bunu da orfoz (*Epinephelus coioides*)'lara oral yolla vererek bir aşı çalışması yaptıklarını bildirmişlerdir. Çalışmanın (2011) sonunda, balıklarda aşılama 7 gün sonra betanodavirusa spesifik antikorların oluştuğu ve TNF- $\alpha$  ile IL-1 $\beta$  ekspresyon seviyelerinin de yükseldiği ifade edilmiştir. Ayrıca bu yöntem ile aşılama RPS % 69.5 bulunarak betanodavirusa karşı balıklarda yüksek oranda koruma etkinliğinin bulunduğu bildirilmiştir (Chen ve ark 2011). Pakingking ve ark (2010), formalin ile inaktive ettikleri betanodavirus (Philippine RGNNV suşu)'u kahverengi orfoz (*Epinephelus fuscogutattus*) balıklarına IM yolla uyguladıkları bir aşı çalışması yapmışlardır. Çalışma sonunda aşı uygulanan gruptaki balıklarda, 15. günde, nötralizan antikor titrelerinde önemli bir artış gözlediklerini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada (2010), betanodavirus ile deneysel olarak enfekte edilen balıklara bu aşı uygulanmış, aşılanan ve aşılınmayan gruplardaki balıklarda kümülatif hayatta kalma oranları karşılaştırılmıştır. Aşılanan grupta, aşılınmayan gruplara göre RPS (% 86)'in daha yüksek olduğu ve aşılınmayan gruplarda aşılınmayan gruplara göre mortalite oranının (% 65-80) daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Takiben ayrı ayrı hazırlanan avirulent aquabirnavirus ve inaktif betanodavirus aşuları, balıklara aynı anda uygulandığında betanodavirusa karşı gelişen bağışıklık düzeyinin koruyucu olduğu ve hastalığın önlenmesinde etkili olabileceği ifade edilmiştir (Yamashita ve ark 2009).

Son yıllarda betanodaviruslara karşı virusun yüzey proteinlerini taklit eden virus benzeri parçacık diye adlandırılan VLP temelli aşı çalışmalarının (Jeong ve ark 2020, Barsøe ve ark 2021a, Barsøe ve ark 2021b) yapıldığı bildirilmiştir. Barsøe ve ark (2021a), hazırladıkları VLP temelli aşularla yaptıkları bir çalışmada, tek doz VNN-

VLP aşısı ile levreklerde yeterince bağışıklık yanıtının oluştuğunu, yaklaşık 9 ay kadar kanda nötralizan antikor varlığının belirlendiğini ve RPS'yi ise en az % 87 olarak tespit ettiklerini ifade etmişlerdir.

### 1.7. Tedavi

Virusların neden olduğu enfeksiyonlardan korunmada, terapötiklerin yetersiz kalmasından dolayı alternatif tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulduğu ifade edilmektedir (Yanuhar ve ark 2020). Betanodavirus ile enfekte balıkların tedavisi konusunda mikroalgler, probiyotikler ve sentetik peptitler ile yapılan birçok araştırma (Majewska ve ark 2015, Zhu ve ark 2019, Yanuhar ve ark 2020, Simón ve ark 2021, Moreno ve ark 2023) yapılmıştır.

Mikroalglerin, balıkların larval dönemlerinde vitamin, mineral, karbonhidrat ve protein ihtiyaçlarının karşılanmasında önemli bir doğal besin kaynağı olduğu bildirilmektedir (Tang ve Suter 2011, Padrós ve ark 2022). Ayrıca *Chlorella vulgaris* türü mikroalgin hücre onarım potansiyeline sahip, doğal alternatif bir besin kaynağı olduğu ifade edilmektedir (Yanuhar ve ark 2020). Yanuhar ve ark (2020) yaptıkları bir çalışmada, betanodavirus ile enfekte orfozlarda böbrek, beyin ve göz gibi organlarda *Chlorella vulgaris* ekstraktının hücre onarımı konusunda etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Probiyotikler, yeterli miktarlarda alındığında konakçıya yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Simón ve ark 2021). *Shewanella putrefaciens*'in, sağlıklı çipuraların derisinde bulunan doğal bir probiyotik olduğu bildirilmiştir (Chabrillón ve ark 2006). *Shewanella putrefaciens*'in, çipura ve dil balıkları üzerinde bu türleri çeşitli bakteriyel patojenlere karşı koruduğu kanıtlanmış bir probiyotik olduğu ifade edilmiştir (Moreno ve ark 2023). Moreno ve ark (2023) yaptıkları bir çalışmada, *Shewanella putrefaciens* ekstraktının, levreklerde betanodavirusa karşı in vivo ve in vitro olarak antiviral etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmada (2023), in vivo olarak ekstraktın oral yolla verildiği gruptaki balıklarda, kontrol grubundaki balıklara kıyasla yemden yararlanma oranı (feed conversion ratio-FCR)'nin daha yüksek tespit edildiği bildirilmiştir. İn vitro olarak ise ekstraktın uygulandığı gruptaki E-11 hücrelerinde, kontrol grubu hücrelere kıyasla virusun RNA2 kopya sayısında azalma olduğu ifade edilmiştir.

Covid-19 pandemisi döneminde hastaların tedavisi sırasında da araştırılan İzoprinosin'in, betanodaviruslar üzerinde in vivo ve in vitro ortamlarda etkili olduğu ifade edilmiştir (Zhu ve ark 2019). İzoprinosin (*Inosine pranobex*)'in, konakçının bağışıklık tepkilerini in vivo olarak artırarak immunomodulatör etki gösterdiği ve antiviral özelliklere sahip sentetik bir pürin türevi olduğu bildirilmiştir. İzoprinosin (*Inosine pranobex*)'in, konakçının bağışıklık tepkilerini in vivo olarak artırarak immunomodulatör etki gösterdiği belirtilmektedir (Milano ve ark 1991, Petrova ve ark 2010, Majewska ve ark 2015). İzoprinosin'in, T lenfositlerin sitotoksik ve yardımcı T lenfositlere dönüşümünü düzenlediği bildirilmiştir (Majewska ve ark 2015). Ayrıca bu maddenin IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$  ve IFN- $\alpha$  gibi çeşitli sitokinlerin ekspresyonunu da artırdığı ifade edilmektedir (Petrova ve ark 2010, Majewska ve ark 2015). Zhu ve ark (2019) yaptıkları deneysel bir çalışmada, İzoprinosin'in, betanodavirus ile enfekte SSN-1 hücrelerinde oluşan CPE'lerde bir azalma gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca İzoprinosin, zebra balıklarına uygulandığında, bazı sitokin (IL-1b, IFN ve TNF- $\alpha$ )'lerin ekspresyon seviyelerini artırdığı ifade edilmiştir (Zhu ve ark 2019).

### **1.8. Örnekleme Yapılan Lagünler ve Özellikleri**

Yaban hayat alanları içerisinde zengin biyoçeşitliliği ile lagünler, balıkların önemli yaşam alanları arasında yer alır. Göç eden balıklar yaşamlarının bir kısmını bu alanlarda geçirebilirler (Uysal ve ark 2008). Lagünler dalgalar tarafından oluşturulan kıyı birikim şekilleri olarak nitelendirilen okyanus ve denizlerle doğrudan bağlantılı halk arasında 'denizkulağı' olarak da adlandırılan göllerdir (İsla 1995). Karasal ve denizel etki altında bulunan lagünler, hem deniz suyu hem de tatlı su kaynaklarından beslenirler ve birbirine karışan bu sular sayesinde 'acı su' içerirler. Lagünler, denizlerle doğrudan bağlantılı olmaları nedeniyle belirli dönemlerde ya da tüm mevsim boyunca denizlerde yaşayan birçok balık türüne ev sahipliği yaparlar ve kendine özgü habitata ile balıklar için doğal bir yaşam ortamı oluştururlar. Birçok balık türü (levrek, çipura, kefal, minekop, mırmır) deniz kıyısında yer alan bu lagünleri yumurtlama alanı olarak kullanmaktadır. Aynı zamanda lagünler, yavru balıklar için olumsuz hava koşullarında barınma ve beslenme açısından önemli alanlardır (Katselis ve ark 2007). Akdeniz bölgesinde birçok lagün yer alır. Bunlar arasında Akyatan, Akgöl-Paradeniz ve Beymelek aktif olarak balıkçılığın yapıldığı büyük lagünlerdir.

Adana Akyatan Lagünü: Adana il merkezine 48 km, Karataş ilçesine 3 km

uzaklıkta yer alır ve 14700 hektar (ha) toplam alanı olan lagünün su ile kaplı alanı yaklaşık 4900 ha'dır. Uzunluğu 17 km, genişliği 4 km olan Akyatan lagününün derinliği ise 1 m civarındadır.

Mersin Akgöl - Paradeniz Lagünü: Mersin ili Silifke ilçesi sınırları içerisinde yer alan ve iki ayrı (Akgöl ve Paradeniz) gölden oluşan lagünün toplam alanı 2100 ha olup derinliği yaklaşık 1,5 m civarındadır.

Antalya Beymelek Lagünü: Antalya ili Demre ilçesi sınırlarında yer alır ve toplam alanı 255 ha olup 6 km kıyı uzunluğuna ve yaklaşık 3 m derinliğe sahiptir.

Bu lagünler levrek, çipura ve kefal gibi birçok balık türüne ev sahipliği yaparlar ve kefal balıklarının tüm balıklar içinde baskın tür olduğu ifade edilmektedir (Ergene 2000, Keser ve ark 2011, Türkmen ve ark 2012).

Akdeniz bölgesinde bulunan Akyatan, Akgöl-Paradeniz ve Beymelek lagünlerinde levrek, çipura ve kefal türü balıklarda VNNV'nin varlığı daha önce hiç araştırılmamıştır. Bu çalışma ile Akdeniz bölgesindeki lagünlerde bulunan balıklarda VNNV'nin varlığı ilk kez araştırıldı. Bu çalışma ile yetiştiriciliğe alınacak anaç balıkların temin edildiği lagünlerde yetişen Levrek, Çipura ve Kefal balıklarında VNNV'nin mevcut durumunun ortaya konması amaçlandı. Ayrıca Akdeniz bölgesinde bulunan Akyatan, Akgöl-Paradeniz ve Beymelek lagünlerinde yıl içerisinde düşük (15-20 °C) ve yüksek (25 °C ve üzeri) su sıcaklığına sahip mevsimlerde doğal şartlarda yetişen deniz balıklarında (Levrek, Çipura ve Kefal) VNNV'nin genom varlığının RT-qPCR metodu ile araştırılması, tespit edilecek virusun hücre kültüründe izolasyonunun yapılması ve filogenetik analizle virusun genotipinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereç

#### 2.1.1. Etik Kurul Raporu

Çalışmaya başlamadan önce Akdeniz Su Ürünleri Araştırma, Üretme ve Eğitim Enstitüsü Müdürlüğü bünyesinde yer alan, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 13.04.2020 tarih ve 2020/04 sayılı Etik Kurul raporu alındı (Ek-A).

#### 2.1.2. Örneklerin Temin Edildiği Lagünler

Çalışma kapsamında Akdeniz bölgesinde bulunan Adana-Akyatan, Mersin-Akgöl Paradeniz ve Antalya-Beymelek olmak üzere 3 lagün, örnekleme bölgesi olarak belirlendi. Bu lagünlerde doğal olarak bulunan Levrek (*Dicentrarchus labrax*), Çipura (*Sparus aurata*) ve Kefal (*Mugil spp.*) balıkları örneklendi (Şekil 2.1 ve 2.2).



Şekil 2.1. Çalışmada örnekleme yapılan lagünler.



**Şekil 2.2.** 4. dönem Adana Akyatan lagününden yapılan örnekleme çalışması A. Lagün girişinde bulunan tuzak kafesler, B. Tuzak kafeslere giren balıkların alınması, C. Örneklenen Kefal türü balıkların strafor kutulara konulması.

### 2.1.3. Örnekleme

İki yıl süresince (2021-2022) altı aylık (Şubat/Mart-Ağustos/Eylül) periyotlarda 4 kez örnekleme yapıldı. WOA (2015)'in akuatik hayvanlarda sörveyans tablosuna göre % 10 prevalans ve % 100 sensitivite-spesifite hesabı yapılarak lagünlerden alınacak örneklerin sayısı 30 adet olarak belirlendi. Böylece örnekleme dönemlerinde, her tür için lagün ağzlarında bulunan tuzak kafesleri ve ağ germe yöntemiyle 30'ar adet balık yakalandı. Çalışmada her türden 360 adet balık olmak üzere dört dönem boyunca toplamda 1080 adet balık örneklendi. (Tablo 2.1). Lagün su sıcaklıklarının en düşük (15-20°C) ve en yüksek (25°C ve üzeri) olduğu aylar örnekleme zamanı olarak belirlendi. Ayrıca, örnekleme dönemlerinin belirlenmesinde, lagünlerdeki balık popülasyonunun durumu da dikkate alındı.

**Tablo 2.1.** Örneklenen balıkların tür, lokasyon ve sayı bilgileri.

Örnekleme Dönemi	Örnekleme Yapılan Lokasyonlar	Örnekleme Yapılan Balık Türleri ve Sayıları		
		Levrek	Çipura	Kefal
1	Antalya Beymelek Lagünü	30	30	30
	Adana Akyatan Lagünü	30	30	30
	Mersin Akgöl-Paradeniz Lagünü	30	30	30
2	Antalya Beymelek Lagünü	30	30	30
	Adana Akyatan Lagünü	30	30	30
	Mersin Akgöl-Paradeniz Lagünü	30	30	30
3	Antalya Beymelek Lagünü	30	30	30
	Adana Akyatan Lagünü	30	30	30
	Mersin Akgöl-Paradeniz Lagünü	30	30	30
4	Antalya Beymelek Lagünü	30	30	30
	Adana Akyatan Lagünü	30	30	30
	Mersin Akgöl-Paradeniz Lagünü	30	30	30
	<b>Toplam</b>	<b>360</b>	<b>360</b>	<b>360</b>
		<b>1080</b>		

#### **2.1.4. Hücre Kültürü**

Çalışmada, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (World Organization for Animal Health-WOAH)'nın Viral Nervöz Nekrozis Referans Laboratuvarı (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Dipartimento di Ittiopatologia, Italy)'ndan İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından temin edilen ve Viroloji Bölümü'nde stoklanan SSN-1 (*Striped snakehead*) hücre hattı kullanıldı. Hücre üretme vasatı olarak % 1'lik antibiyotik-antimikotik solüsyonu (Sigma Aldrich, Amerika), % 1'lik HEPES (Sigma Aldrich, Almanya) ve % 10'luk FBS (Biowest, Fransa) içeren L-15 (Gibco, Amerika) vasatı kullanıldı.

#### **2.1.5. Referans Virus**

Çalışmada, RT-qPCR testinde pozitif kontrol olarak kullanılacak olan WOAH'ın VNN Referans Laboratuvarı (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Dipartimento di Ittiopatologia, Italy)'ndan İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından temin edilen referans betanodavirus (475/198) suşu kullanıldı.

#### **2.1.6. Viral Nükleik Asit Ekstraksiyonu**

Çalışmada örneklerden viral nükleik asit ekstraksiyonunda, ticari ekstraksiyon kiti (MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, Roche, Almanya) ve İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Viroloji Bölümü'nde bulunan otomatik ekstraksiyon cihazı (Roche MagNA Pure LC System) kullanıldı.

#### **2.1.7. RT-qPCR**

Çalışma kapsamında alınan örneklerde betanodavirus genomunun tespit edilebilmesi için ticari kit (Real Time Ready Virus Master, Roche, Almanya) ve İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Viroloji Bölümü'nde bulunan Real Time PCR (Roche LightCycler®480 II) cihazı kullanıldı.

### **2.2. Yöntem**

#### **2.2.1. Örneklerin Alınması**

Çalışmada rastgele örnekleme metodu ile juvenil boy (6 cm  $\geq$ )'un üzerinde olan yetişkin balıklar örneklendi. Bu çalışmada örnekleme yapılırken, her bir tür için

avlanma boyutunun yasal sınırları (Levrek  $\geq 25$ , Çipura  $\geq 20$ , Kefal  $\geq 20$  cm olmalı) dikkate alınmadı ve buna göre ağ ile avlanma materyalleri kullanıldı. Örneklerin alınması için lagünlerin bağlı olduğu ildeki Tarım ve Orman İl Müdürlüğü personeli ve lagün çalışanları ile birlikte iki tekne arasına gerilen ağa takılan ve lagün girişindeki tuzak kafeslere giren balıklar toplandı. Alınan balıklar strafor kutular içerisinde soğuk zincir şartları korunarak en geç 24 saat içerisinde laboratuvara getirildi.

### 2.2.2. Laboratuvara Getirilen Örneklerin Kaydedilmesi

Örneklerin belli bir sistematik ile kaydedilmesinde lagünlere ve balıklara, örnekleme dönemini de belirtecek şekilde sayı ve harflerden oluşan kodlar verildi (Tablo 2.2). Örnekler, alındığı dönem için 1,2,3 ve 4 rakamları, lokasyon için A (Beymelek), B (Akgöl-Paradeniz), C (Akyatan) harfleri, balık türleri için ise L (Levrek), Ç (Çipura), ve K (Kefal) harfleri kullanılarak kodlandı.

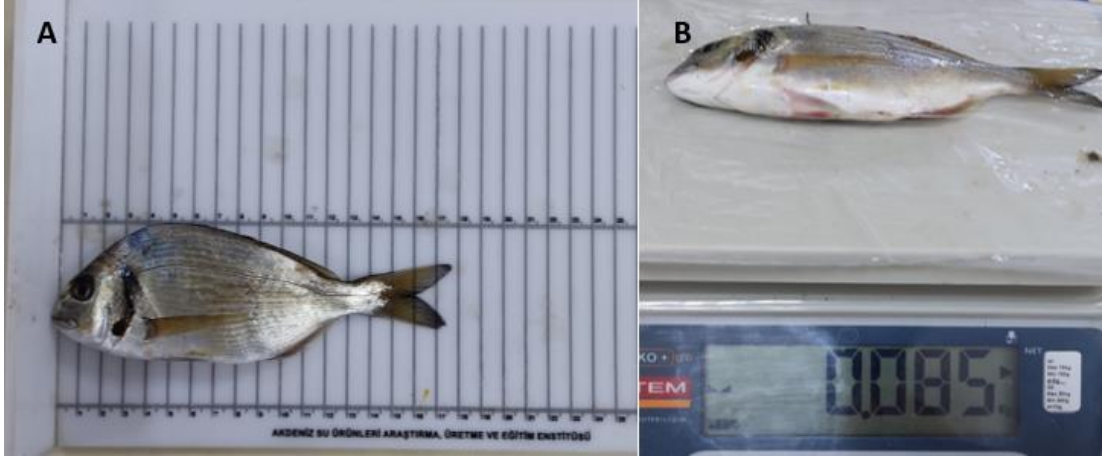
**Tablo 2.2.** Örneklenen balıkların lokasyon, tür, dönem ve sayı bilgilerini gösteren kodlamalar

Örnekleme Yeri	Tür	1. Dönem	2. Dönem	3. Dönem	4. Dönem	Toplam
Beymelek	Levrek	1AL (30)*	2AL (30)	3AL (30)	4AL (30)	120
	Çipura	1AÇ(30)	2AÇ(30)	3AÇ(30)	4AÇ(30)	120
	Kefal	1AK(30)	2AK(30)	3AK(30)	4AK(30)	120
Akgöl-Paradeniz	Levrek	1BL(30)	2BL(30)	3BL(30)	4BL(30)	120
	Çipura	1BÇ(30)	2BÇ(30)	3BÇ(30)	4BÇ(30)	120
	Kefal	1BK(30)	2BK(30)	3BK(30)	4BK(30)	120
Akyatan	Çipura	1CÇ(30)	2CÇ(30)	3CÇ(30)	4CÇ(30)	120
	Levrek	1CL(30)	2CL(30)	3CL(30)	4CL(30)	120
	Kefal	1CK(30)	2CK(30)	3CK(30)	4CK(30)	120

\* Alınan balık sayısı

### 2.2.3. İstatistik Analiz

Her bir türe ait balıklar bireysel olarak boy ve ağırlıkları alınarak tek numune olarak çalışıldı. Çalışmada örneklenen balıkların boyları 1 mm hassasiyetli ölçüm tahtasıyla, ağırlıkları ise 0,01 gr hassasiyetli terazi ile tartılarak tüm bilgiler kaydedildi (Şekil 2.3-6). Elde edilen boy ve ağırlık değerleri SPSS 15.0 paket programı ile  $\alpha=0,05$  güven aralığında istatistiksel olarak homojenlik testi ve varyans analizi (One-way ANOVA)'ne tabi tutuldu.



Şekil 2.3. Lagünlerden örneklenen balıkların boy (A) ve ağırlık (B) bilgilerinin kaydedilmesi.



Şekil 2.4. Adana Akyatan lagününden 4. dönemde alınan çipuraların makroskobik muayene ve bilgi kayıtları için rastgele dizilimi.



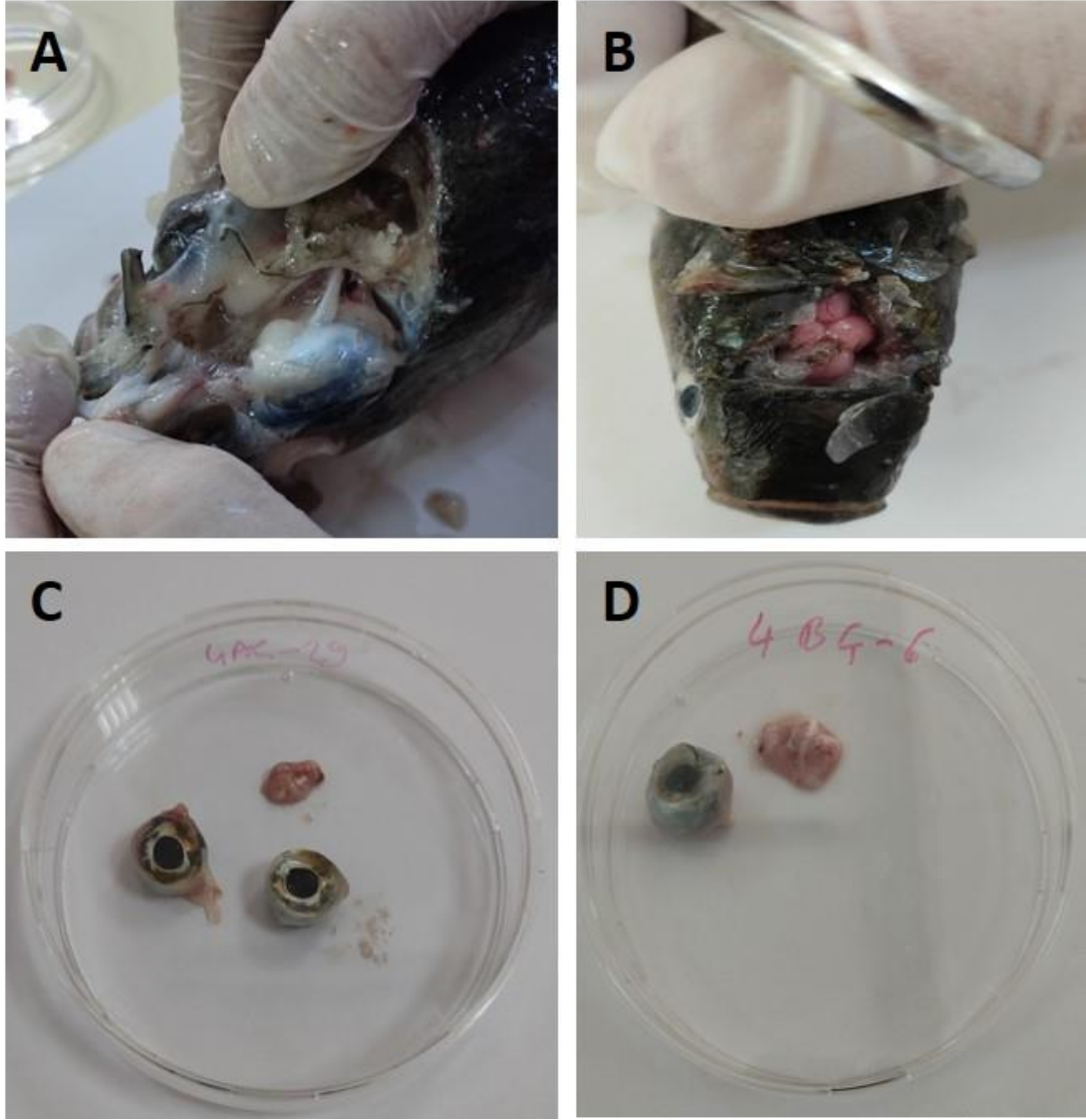
Şekil 2.5. Adana Akyatan lagününden 4. dönemde alınan levreklerin makroskobik muayene ve bilgi kayıtları için rastgele dizilimi.



**Şekil 2.6.** Mersin Akgöl-Paradeniz lagününden 4. dönemde alınan kefallerin makroskobik muayene ve bilgi kayıtları için rastgele dizilimi.

#### **2.2.4. Balıkların Makroskobik Muayenesi ve Örneklerin Alınması**

Çalışmada örneklenen her balık bireysel olarak incelenerek herhangi bir yaralanma ve lezyon varlığı yönünden makroskobik olarak muayene edildi (Şekil 2.3-6). Laboratuvara getirilen balıkların kafatasları usulüne uygun şekilde kesit atılarak açıldıktan sonra beyin ve gözleri, aseptik şartlarda pens ve makas yardımıyla alınarak steril petrilere aktarıldı (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Dördüncü dönem örneklerinden (A-B) beyin ve gözlerin alınarak süspansiyon oluşturmak için steril petrilere aktarılması (C-D).

### 2.2.5. Örneklerin Hazırlanması

ESCO Class II-A biyogüvenlik kabini (ESCO Lifesciences Group, Singapur)'nde, her bir petriye bireysel olarak alınan balıkların göz ve beyinleri, % 2 Fötal Dana Serum-FBS (BI-Biological Industries, İsrail), %1 antibiyotik-antimikotik solüsyon (Sigma Aldrich, Almanya)'u içeren glutaminli L-15 (Leibovitz with glutamine, Sigma Aldrich, Amerika) vasatı ile 1/10 (organ/vasat) oranında sulandırıldı ve steril kum (Sigma Aldrich, Almanya) ile parçalandı. Elde edilen süspansiyonlar otomatik pipetör (Onilab Levo Plus Biolab, Singapur) yardımıyla 15 ml'lik santrifüj tüplerine (Isolab GmbH, Almanya) aktarıldı. Daha sonra doku süspansiyonları santrifüj cihazında (Hettich Micro 22-R, Almanya) 3500 rpm'de (Revolutions Per Minute-dakikadaki devir sayısı) 4 °C'da 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası

tüpün üst kısmında bulunan süpernatantlar 0.45 µm filtreden (Isolab GmbH, Almanya) geçirildi (Şekil 2.8). Ardından elde edilen süpernatantlar ilgili kod ve numaralarına göre 2 ml hacimli cryovial tüplere (Isolab GmbH, Almanya) alınarak ekstraksiyon işlemi yapılana kadar -80°C'da (Sanyo, Japonya) stoklandı.



Şekil 2.8. Alınan örneklerin biyogüvenlik kabininde hazırlanması.

### 2.2.6. Hücre Kültürünün Hazırlanması

RT-qPCR'da pozitif kontrol olarak kullanılacak referans betanodavirusun (475/198) üretilmesinde SSN-1 (*Striped snakehead*) devamlı hücre hattı kullanıldı. Hücre üretme vasatı olarak % 1'lik antibiyotik-antimikotik solüsyonu, % 1'lik HEPES ve % 10'luk FBS içeren L-15 vasatı kullanıldı. 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü flaskında hazırlanan ve yüzeyi % 80 oranında kaplayan monolayer hücrelerin üzerindeki vasat döküldü. Ardından flask yüzeylerine 2 kez 2 ml Tripsin-EDTA (Sigma Aldrich,

Almanya) ilave edildi ve her seferinde flask yatay konumda birkaç kez sallanarak solüsyonun yüzey ile tamamen temas etmesi sağlandıktan sonra solüsyonun tamamı döküldü. Ardından tekrar 2 ml Tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildi. Hücreler, flask yüzeyinden tamamen ayrıldığında %10'luk FBS içeren 5 ml L-15 vasatı ilave edildi ve oda sıcaklığında 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Daha sonra altta kalan hücre peleti L-15 vasatına alınarak hücre süspansiyonu elde edildi. Süspansiyondan 24 saatte en az % 80 monolayer hücre olacak şekilde 24 gözlü hücre kültürü pleytinde her bir göze 1000 µl konularak 25 °C'da karbondioksit (CO<sub>2</sub>)'li etüvde inkubasyona bırakıldı.

### **2.2.7. Referans Virusun Üretilmesi**

Bu amaçla 2.2.6'da belirtildiği şekilde hazırlanan 75 cm<sup>2</sup>lik hücre kültürü flaskında SSN-1 hücreleri monolayer olarak üretildi. Çalışmada, RT-qPCR testinde pozitif kontrol olarak kullanılacak olan WOAH'ın VNN Referans Laboratuvarı (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Dipartimento di Ittiopatologia, İtalya)'ndan İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından temin edilen referans betanodavirus (475/198) suşu kullanıldı. 75 cm<sup>2</sup>lik hücre kültürü flaskında üretilen hücrelerin vasatları döküldü ve 3 ml virus ilave edilerek 25 °C'da 1 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyonun ardından % 10'luk 30 ml L-15 vasatı ilave edildi. CPE yönünden günlük olarak doku kültürü mikroskop (Olympus, Japonya)'unda kontrol yapılarak % 80 etki görüldüğünde -80 °C'da 2 kez dondurulup 25 °C'da çözündürülerek 4 °C'da 3500 rpm'de 20 dakika süreyle santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant porsiyonlanarak daha sonra kullanılmak üzere -80 °C'da stoklandı.

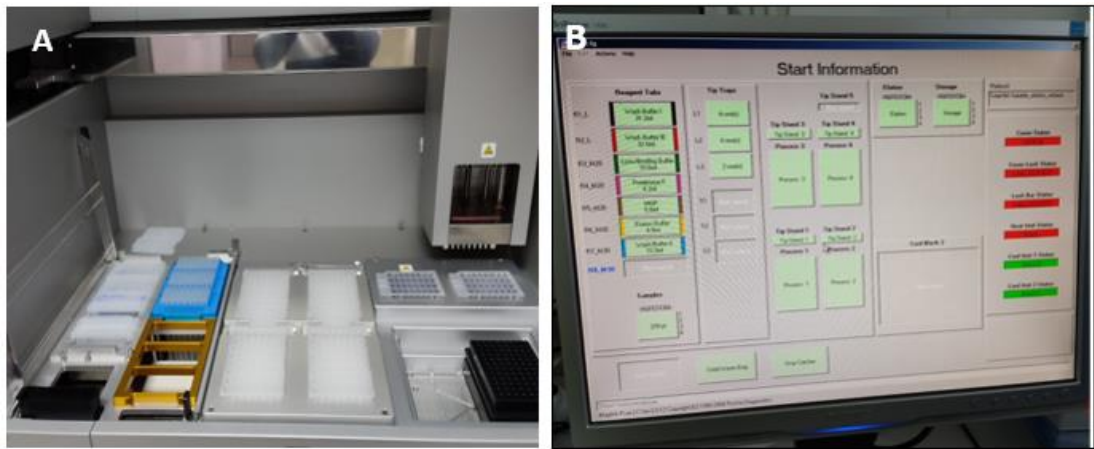
### **2.2.8. Referans Virusun Mikrotitrasyon Yöntemiyle Titrasyonu**

Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan referans betanodavirusun titresinin belirlenmesi, Frey ve Liess (1971)'in bildirdikleri mikrotitrasyon metodunda göre yapıldı. Buna göre test edilecek virusun L-15 vasatı içerisinde logaritma 10 tabanına göre sulandırma (10<sup>-1</sup> - 10<sup>-8</sup>)'ları yapıldı. Her sulandırma basamağından, mikrotitrasyon pleytlerinin her bir sırasında bulunan 4 göze 0,1 ml aktarıldı. Referans betanodavirusun titrasyonunda kontrol için ayrılan 4 göze 0,05 ml serumsuz L-15 vasatından ve 0,05 ml referans betanodavirus konuldu. Hücre kontrolü için ayrılan 4 göze ise 0,1 ml serumsuz L-15 vasatı konuldu. Ardından referans betanodavirus titrasyonu yapılan pleytin gözlerine 0,05 ml SSN-1 hücre süspansiyonundan ilave

edilerek mikrotitrasyon pleytleri 25 °C'lık % 2.5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkubasyona bırakıldı. Daha sonra pleytler doku kültürü mikroskobunda 10 gün süreyle CPE yönünden kontrol edildi. Pleytler mikroskopta kontrol edildikten sonra kristal violet ile boyanarak değerlendirmeler yapıldı. Referans betanodavirusun titreleri (doku kültürü infeksiyöz doz 50-DKID<sub>50</sub>), Spearman (1908) ve Karber (1931)'in bildirdiği metoda göre hesaplandı.

### 2.2.9. RNA Ekstraksiyonu

Ekstraksiyonda, içeriğinde Wash Buffer (I, II ve III), Lysis/Binding Buffer, Proteinase K, Proteinase K Buffer II, Magnetic Glass Particles (MGP) ve Elution Buffer solüsyonları bulunan total nükleik asit izolasyon kiti (MagNA Pure LC, Roche, Almanya) kullanıldı. RNA ekstraksiyonu, ticari ekstraksiyon kiti kullanılarak otomatik ekstraksiyon cihaz (Roche MagNA Pure LC)'ında talimatlar doğrultusunda yapıldı (Şekil 2.9). Bu amaçla 2.2.5'de belirtildiği gibi hazırlanan her bir örnekten 200 µl inokulum alınarak 32 gözlü ekstraksiyon pleytlerine (MagNa Pure-Roche, Almanya) konuldu. Ekstraksiyon işleminin doğruluğunun belirlenmesi ve örnekler arası olası bir kontaminasyonun önlenmesi amacıyla 32 gözlü pleytte 30 göze saha örnekleri, 31. göze pozitif kontrol, 32. göze ise negatif kontrol konuldu. Pozitif kontrol olarak referans betanodavirus (475/198) suşu, negatif kontrol olarak ise materyal hazırlamada kullanılan L-15 vasatı kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi tamamlanan örnekler test edilene kadar kısa sürede kullanılacaksa 4 °C'da, daha uzun bir süre kullanılmayacaksa -80 °C'da muhafaza edildi.



**Şekil 2.9.** Otomatik ekstraksiyon cihazının (Roche MagNA Pure) hazırlanması (A) ve üreticinin talimatları doğrultusunda gerekli kimyasalların cihaza yüklenerek bilgisayar ekranından kontrolleri sağlanması (B).

### 2.2.10. Mastermix Hazırlama

RT-qPCR işlemi için, Tablo 2.4'de belirtilen primer ve prob setleri ve kimyasallar, kit protokolüne uygun olarak Tablo 2.3'de belirtildiği gibi her bir örnek için reagent ve miktarları belirlenerek hazırlandı.

**Tablo 2.3.** Real Time PCR mastermiksi hazırlamada kullanılan reagentlar ve miktarları.

Kullanılan Reagent	Her bir Örnek İçin Miktar (µl)
H <sub>2</sub> O	7,6
F Primer (10 PMol-Pikomol)	1
R Primer (10 PMol)	1
Prob (10 PMol)	1
Buffer (5x)	4
Enzim	0,4
RNA Miktarı	5
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20</b>

### 2.2.11. RT-qPCR

RNA amplifikasyonunda ticari kit (Real Time Ready Virus Master, Roche, Almanya) ve Real Time PCR (Roche LightCycler® 480 II) cihazı kullanıldı. Real Time PCR testinde, betanodavirusun RNA2 geninin T4 bölgesinin filogenetik analizine göre dizayn edilen, WOAH (2019)'ın önerdiği, Panzarin ve ark (2010) tarafından bildirilen genetik dizilimdeki primer ve prob setleri kullanıldı (Tablo 2.4).

**Tablo 2.4.** Çalışmada kullanılan primer ve prob dizileri.

Primer	Hedef Genom	5'- 3' Sekans	Amplikon Boyutu (bp)	Referans
RNA2 FOR RNA2 REV RNA2 Probe	RNA2	CAA-CTG-ACA-RCG-AHC-ACA-C	69	Panzarin ve ark 2010
		CCC-ACC-AYT-TGG-CVA-C		
		TYC-ARG-CRA-CTC-GTG-GTG-CVG		

Tablo 2.3'de belirtildiği gibi hazırlanan mastermiks, 96 gözlü PCR pleytlerine (Roche LightCycler® 480 Multiwell Plate 96) her bir kuyucuğa 15'er µl konularak üzerine 5 µl örnek ilave edildi. Daha sonra örneklerin haricinde belirlenen iki kuyucuğa da 15'er µl mastermiks, 5 µl pozitif kontrol ve 5 µl negatif kontrol konuldu. Pleytin üzeri, örneklerin birbirine karışmasını önleyecek şekilde şeffaf bant ile

kapatıldıktan sonra 1500 g (gravite)'de ve 4 °C'da 2 dakika süre ile santrifüj edilerek PCR cihazının yuvasına yerleştirildi.

Amplifikasyon için Tablo 2.5'de belirtildiği şekilde ısı ve süreyi gösteren reaksiyon koşulları oluşturularak RT-qPCR işlemi yapıldı. RT-qPCR işleminde her tür için 30 numuneden oluşan örnekler olası bir karışıklığı önlemek adına ayrı ayrı test edilerek sonuçları kayıt altına alındı. PCR cihazına konulan örnekler ve pozitif kontrollere ait cycle threshold (ct) değerleri bilgisayar programı yardımıyla hesaplanarak sonuçlar değerlendirildi.

**Tablo 2.5.** RT-qPCR reaksiyonu sıcaklık, süre koşulları ve döngü sayıları.

RT (1 Döngü)	Komplementer DNA'ya çevrilme	53°C 50°C	4 Dakika 6 Dakika
	RT İnhibisyonu	95°C	65 Saniye
PCR (45 Döngü)	Ön Denaturasyon	95°C	10 Saniye
	Bağlanma ve Sentez	54°C	30 Saniye
	Uzama	72°C	1 Saniye

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Örnekleme Bölgesi ve Örneklerle Ait Bulgular

##### 3.1.1. Balıkların Boy ve Ağırlık Bulguları

Elde edilen boy ve ağırlık değerleri SPSS 15.0 paket programı ile  $\alpha=0,05$  güven aralığında istatistiksel olarak homojenlik testi ve varyans analizi (One-way ANOVA)'ne tabi tutuldu. Tablo 3.3-14'de belirtildiği gibi örneklerle ilgili kod numaraları verilerek boy ve ağırlık bilgileri ölçülerek kaydedildi. Çalışmada kullanılan balıkların boylarına ve ağırlıklarına ait istatistiksel veriler Tablo 3.1 ve 3.2'de belirtildi.

Lagünlerden dönemlere göre balık türleri (Levrek, çipura ve kefal) için elde edilen örneklerin boy verileri homojen dağılım gösterdi. Akyatan Lagünü'nden elde edilen boy verilerinin varyansı diğer lagünlerden (Akgöl-Paradeniz ve Beymelek) elde edilen boy verilerine ait varyanslardan farklılık gösterdi, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0,05$ ).

Levrek boy verileri lagünlere (Akyatan, Akgöl-Paradeniz ve Beymelek) göre homojen dağılım gösterdi ve varyanslar arasında fark görülmedi ( $p>0,05$ ). Beymelek lagünü'nden dönemsel olarak elde edilen levrek örneklerinin boy verilerine ait varyanslar istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir farklılık gösterdi ( $p>0,05$ ).

Çipura boy verileri lagünlere (Akyatan, Akgöl-Paradeniz ve Beymelek) göre homojen dağılım gösterdi ve varyanslar arasında fark görülmedi ( $p>0,05$ ).

Kefal boy verileri lagünlere (Akyatan, Akgöl-Paradeniz ve Beymelek) göre homojen dağılım gösterdi ve varyanslar arasında fark görülmedi ( $p>0,05$ ).

**Tablo 3.1.** Farklı dönemlerde lagünlerden örneklenen balıkların boy değerleri (cm, Ortalama  $\pm$  S.H., min-max).

Lokasyon	Dönem	Levrek *	Çipura *	Kefal *
Beymelek	1	*46,03 $\pm$ 1,23 32-63	19,97 $\pm$ 1,03 8-31	29,23 $\pm$ 1,77 7-40
	2	26,73 $\pm$ 1,04 17-36	21,68 $\pm$ 0,68 20-25	28,43 $\pm$ 1,18 14-42
	3	32,33 $\pm$ 0,75 20-39	25,23 $\pm$ 0,62 19-32	27,63 $\pm$ 0,37 24-32
	4	31,00 $\pm$ 0,86 19-38	26,00 $\pm$ 0,75 19-33	33,37 $\pm$ 0,71 27-43
Akyatan	1	25,87 $\pm$ 1,23 8-36	17,10 $\pm$ 0,78 7-25	24,73 $\pm$ 1,37 8-38
	2	25,20 $\pm$ 0,35 20-28	15,62 $\pm$ 0,40 11-22	29,17 $\pm$ 0,74 23-39
	3	26,40 $\pm$ 0,60 23-37	24,60 $\pm$ 0,69 18-32	23,43 $\pm$ 1,02 18-37
	4	26,13 $\pm$ 0,54 22-31	17,83 $\pm$ 0,38 10-21	39,07 $\pm$ 1,10 11-46
Akgöl	1	19,87 $\pm$ 1,06 6-28	16,47 $\pm$ 0,65 7-21	19,30 $\pm$ 0,90 12-33
	2	26,73 $\pm$ 1,04 10-36	22,00 $\pm$ 0,50 18-34	21,23 $\pm$ 0,32 18-24
	3	31,28 $\pm$ 0,82 19-37	25,97 $\pm$ 0,18 24-28	22,40 $\pm$ 0,52 17-27
	4	30,33 $\pm$ 1,63 7-40	24,80 $\pm$ 1,02 6-29	19,93 $\pm$ 0,54 13-31

\* cm, Ortalama;  $\pm$  Standart Hata (SH); min-max

Lagünlerden (Akyatan, Akgöl-Paradeniz ve Beymelek) örnekleme dönemlerine göre elde edilen ağırlık verileri incelendiğinde; Akyatan lagününden elde edilen dönemsel verilerin homojenliğinde önemsiz ( $p>0,05$ ) bir farklılık gözlemlendi. Diğer lagünlere ait veriler ise tamamen homojen dağılım gösterdi. Akyatan Lagünü'nden elde edilen bireylere ait veriler için varyanslarda görülen istatistiksel farklılık anlamlı bulunmadı ( $p>0,05$ ). Akgöl-Paradeniz ve Beymelek lagününden elde edilen verilerin varyansları arasında önemli bir farklılık tespit edilmedi ( $p>0,05$ ).

Levrek ağırlık verileri lagünlere göre homojen bir dağılım gösterdi ve varyanslar arasında Akyatan Lagünü verileri arasında diğer lagünlere göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ( $p>0,05$ ) bulunmadı.

Çipura ağırlık verileri lagünlere göre homojen dağılım gösterdi ve varyanslar arasında fark görülmedi ( $p>0,05$ ).

Kefal ağırlık verilerinin homojenliğinde Akyatan lagününde önemsiz ( $p>0,05$ ) bir farklılık tespit edildi. Akgöl-Paradeniz ve Beymelek lagünlerinden elde edilen veriler ise homojen dağılım gösterdi. Akgöl lagününden elde edilen Kefal ağırlık değerlerinin varyansı diğer lagünlerden (Akgöl-Paradeniz ve Beymelek ) elde edilen verilere göre önemli ( $p<0,05$ ) olmayan bir farklılık gösterdi.

**Tablo 3.2.** Farklı dönemlerde lagünlerden örneklenen balıkların ağırlık değerleri (gr, Ortalama  $\pm$  S.H., min-max).

Lokasyon	Dönem	Levrek *	Çipura *	Kefal *
Beymelek	1	*1051,93 $\pm$ 97,61 114-2102	148,70 $\pm$ 19,62 45-495	313,80 $\pm$ 25,94 60-677
	2	812,13 $\pm$ 114,95 90-2013	172,63 $\pm$ 3,97 126-229	281,23 $\pm$ 24,85 157-884
	3	347,70 $\pm$ 20,48 171-540	234,76 $\pm$ 20,44 84-486	210,93 $\pm$ 9,38 111-341
	4	364,57 $\pm$ 21,43 133-555	292,66 $\pm$ 28,79 105-710	383,17 $\pm$ 16,65 255-610
Akyatan	1	258,67 $\pm$ 18,27 85-506	78,06 $\pm$ 5,66 38-207	223,70 $\pm$ 23,50 65-568
	2	167,70 $\pm$ 18,27 85-506	65,10 $\pm$ 2,57 39-95	275,70 $\pm$ 23,88 150-576
	3	209,63 $\pm$ 16,87 143-577	228,66 $\pm$ 20,13 84-486	135,40 $\pm$ 22,86 57-462
	4	190,00 $\pm$ 12,67 105-315	94,83 $\pm$ 3,74 45-135	606,00 $\pm$ 28,75 120-905
Akgöl	1	204,10 $\pm$ 54,50 58-1778	72,20 $\pm$ 3,95 38-141	80,37 $\pm$ 11,41 19-320
	2	472,20 $\pm$ 18,61 302-882	168,93 $\pm$ 6,10 103-230	70,60 $\pm$ 2,84 45-99
	3	369,27 $\pm$ 20,18 126-558	351,83 $\pm$ 7,40 262-429	93,77 $\pm$ 5,46 37-137
	4	363,50 $\pm$ 28,06 65-665	310,86 $\pm$ 18,39 66-405	69,17 $\pm$ 3,72 40-110

\* cm, Ortalama;  $\pm$  Standart Hata (SH); min-max

**Tablo 3.3.** Birinci dönem Beymelek'ten alınan örneklere ait boy ve ağırlık bilgileri.

No	Levrek		Çipura		Kefal	
	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)
1	51	1520	29	331	31	297
2	38	750	30	284	32	348
3	50	1865	28	291	34	356
4	42	1294	29	344	38	550
5	47	1299	18	85	29	236
6	41	950	17	128	33	302
7	47	1232	18	80	35	364
8	58	2013	18	80	33	222
9	61	1800	27	281	28	219
10	63	2102	31	495	32	300
11	43	924	19	95	30	241
12	50	1372	26	241	36	408
13	52	1650	28	321	30	262
14	43	1323	18	98	39	510
15	44	1058	20	150	34	385
16	43	893	19	100	32	273
17	47	1455	19	86	33	324
18	49	1188	21	108	40	677
19	52	1777	18	77	34	378
20	43	1061	19	92	36	410
21	47	114	19	114	34	432
22	44	848	18	94	38	568
23	32	438	20	118	35	393
24	41	776	18	85	32	338
25	40	618	19	97	34	370
26	44	1172	18	89	37	424
27	48	1187	17	84	35	390
28	39	540	18	84	26	198
29	43	980	19	90	33	350
30	39	653	18	87	34	355

**Tablo 3.4.** Birinci dönem Akyatan'dan alınan örneklere ait boy ve ağırlık bilgileri.

No	Levrek		Çipura		Kefal	
	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)
1	28	236	20	76	29	248
2	31	325	20	113	25	135
3	31	375	19	90	39	749
4	30	322	20	86	30	271
5	27	260	20	92	31	310
6	36	506	19	89	34	366
7	31	279	19	93	25	175
8	28	311	19	76	25	148
9	28	290	20	106	24	140
10	29	323	18	54	37	558
11	27	281	21	94	25	164
12	26	186	18	86	30	253
13	23	163	17	59	26	173
14	21	151	20	106	29	245
15	28	225	17	68	24	158
16	28	290	17	72	25	171
17	29	323	17	64	23	132
18	27	281	20	100	38	568
19	26	186	17	84	23	186
20	23	163	25	207	24	174
21	21	151	16	62	23	130
22	28	225	24	105	24	130
23	31	375	19	85	24	168
24	30	322	17	65	34	366
25	27	260	16	60	24	169
26	36	506	19	86	35	442
27	31	279	16	61	29	248
28	28	311	16	66	23	148
29	28	290	19	65	27	163
30	29	323	16	51	33	337

**Tablo 3.5.** Birinci dönem Akgöl-Paradeniz'den alınan örneklere ait boy ve ağırlık bilgileri

<b>Birinci Dönem Akgöl-Paradeniz Örneklerin Boy ve Ağırlık Bilgileri</b>						
<b>No</b>	<b>Levrek</b>		<b>Çipura</b>		<b>Kefal</b>	
	<b>Boy (cm)</b>	<b>Ağırlık (gr)</b>	<b>Boy (cm)</b>	<b>Ağırlık (gr)</b>	<b>Boy (cm)</b>	<b>Ağırlık (gr)</b>
1	26	150	20	108	21	89
2	27	172	19	90	17	59
3	27	166	18	66	33	320
4	27	173	19	90	22	19
5	25	156	20	108	21	96
6	25	130	18	77	23	116
7	22	122	17	72	23	110
8	20	145	16	53	15	34
9	14	140	15	45	21	100
10	6	153	21	141	30	228
11	18	165	18	86	17	38
12	21	175	18	96	23	151
13	21	170	19	75	13	22
14	21	172	17	59	24	116
15	23	158	17	68	20	78
16	11	132	16	60	20	65
17	14	148	18	83	21	66
18	28	180	16	58	14	27
19	25	168	16	51	22	88
20	15	150	18	77	20	70
21	15	145	16	58	21	81
22	15	155	17	77	14	30
23	16	145	18	69	21	90
24	22	170	19	86	12	19
25	22	165	17	67	15	35
26	25	170	17	72	16	44
27	24	172	18	77	17	37
28	19	160	17	69	23	118
29	28	1778	17	79	21	88
30	22	171	17	68	21	75

**Tablo 3.6.** İkinci dönem Beymelek'ten alınan örneklere ait boy ve ağırlık bilgileri

No	Levrek		Çipura		Kefal	
	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)
1	33	469	23	180	30	224
2	28	230	22	172	33	348
3	30	247	21	138	33	333
4	29	215	23	194	31	276
5	27	186	23	162	30	177
6	35	559	22	161	31	249
7	17	151	23	174	32	298
8	28	220	25	229	32	329
9	27	180	23	199	28	188
10	18	165	22	168	29	211
11	10	90	21	126	28	263
12	28	245	22	155	18	158
13	35	510	23	171	31	181
14	17	145	23	165	32	313
15	30	250	21	154	28	214
16	36	950	22	166	30	258
17	31	1230	23	212	36	413
18	28	2013	23	170	36	384
19	28	1710	22	177	38	448
20	29	2002	21	161	42	884
21	27	924	24	220	28	260
22	26	1372	23	179	23	251
23	23	1550	22	163	25	265
24	21	1328	21	161	22	240
25	28	1058	21	162	25	255
26	28	893	22	159	21	215
27	29	1455	2,5	191	17	185
28	27	1188	23	171	14	160
29	26	1778	22	174	18	157
30	23	1051	22	165	32	300

**Tablo 3.7.** İkinci dönem Akyatan'dan alınan örneklere ait boy ve ağırlık bilgileri

No	Levrek		Çipura		Kefal	
	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)
1	25	157	15	66	29	189
2	24	136	17	74	36	427
3	28	202	16	66	32	361
4	28	194	17	68	27	202
5	26	181	17	84	39	576
6	25	148	17	72	29	255
7	25	156	16	67	26	216
8	26	155	16	87	39	563
9	25	139	16	63	30	253
10	27	197	13	66	34	426
11	27	188	15	56	30	360
12	26	175	16	58	25	182
13	25	161	16	65	35	427
14	25	167	15	55	30	231
15	26	167	15	56	27	166
16	26	138	15	63	27	161
17	25	177	15	60	32	314
18	25	166	16	68	28	195
19	24	148	14	51	29	253
20	22	141	14	50	26	208
21	20	183	12	42	30	507
22	26	170	18	88	27	443
23	28	200	18	85	27	164
24	21	160	22	95	25	151
25	24	154	11	39	27	191
26	27	196	16	66	26	161
27	26	183	17	70	26	159
28	24	132	18	80	28	202
29	27	190	14	51	26	178
30	23	170	11	42	23	150

**Tablo 3.8.** İkinci dönem Akgöl-Paradeniz'den alınan örneklere ait boy ve ağırlık bilgileri

No	Levrek		Çipura		Kefal	
	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)
1	36	555	21	130	22	82
2	38	581	21	114	21	70
3	37	396	23	187	21	71
4	34	445	22	217	21	55
5	31	353	19	104	24	98
6	29	302	22	191	23	82
7	33	427	24	221	21	65
8	32	353	22	184	23	94
9	34	444	23	230	19	54
10	34	463	22	185	22	73
11	33	449	24	192	21	59
12	35	465	22	197	19	45
13	35	519	21	162	23	97
14	37	496	24	156	24	99
15	34	449	22	185	22	83
16	34	466	22	178	24	71
17	35	529	22	189	22	76
18	34	463	18	103	21	62
19	30	478	21	205	21	65
20	29	443	21	132	22	88
21	39	501	22	189	21	63
22	38	478	34	171	20	66
23	34	495	19	121	23	86
24	40	603	22	168	21	75
25	31	389	23	160	18	47
26	32	406	22	186	18	52
27	33	440	20	155	18	51
28	35	486	22	156	19	52
29	32	405	21	160	22	73
30	36	887	18	140	21	64

**Tablo 3.9.** Üçüncü dönem Beymelek'ten alınan örneklere ait boy ve ağırlık bilgileri

No	Levrek		Çipura		Kefal	
	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)
1	31	286	27	275	28	287
2	35	483	24	210	28	227
3	32	333	24	165	27	199
4	30	282	23	170	32	341
5	33	380	24	183	27	189
6	38	535	25	193	27	179
7	31	272	25	201	28	198
8	34	433	25	216	31	258
9	39	291	23	164	26	166
10	39	540	24	173	26	214
11	37	519	23	157	27	198
12	37	531	22	156	27	213
13	29	240	31	418	29	239
14	37	484	24	187	28	242
15	29	258	26	233	31	279
16	30	254	25	220	28	220
17	36	462	23	157	26	171
18	30	357	19	84	26	167
19	31	264	24	191	26	182
20	29	241	23	152	26	188
21	37	510	31	467	28	185
22	34	354	19	89	26	199
23	34	391	25	204	27	185
24	30	288	31	441	26	183
25	29	255	32	460	24	111
26	30	264	29	365	32	318
27	31	250	32	486	29	236
28	30	270	25	209	26	133
29	28	233	24	195	31	263
30	20	171	25	222	26	158

**Tablo 3.10.** Üçüncü dönem Akyatan'dan alınan örneklere ait boy ve ağırlık bilgileri

No	Levrek		Çipura		Kefal	
	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)
1	25	166	18	187	37	462
2	26	186	22	200	23	94
3	26	183	24	165	20	65
4	25	169	23	170	22	83
5	36	439	23	180	23	95
6	27	191	25	193	23	102
7	26	200	25	222	34	320
8	25	205	25	216	21	88
9	37	577	23	164	22	92
10	25	181	24	153	23	94
11	26	181	23	157	20	81
12	28	216	20	136	21	77
13	26	192	31	418	22	76
14	24	170	24	187	34	389
15	24	148	26	233	22	95
16	23	147	25	220	36	439
17	30	323	22	147	36	420
18	25	181	19	84	20	69
19	25	143	24	191	21	75
20	25	175	23	150	22	81
21	26	187	31	467	22	83
22	25	192	19	89	21	89
23	32	319	24	224	20	77
24	25	163	31	431	19	57
25	26	213	31	420	20	81
26	25	185	29	365	20	80
27	24	156	32	486	21	75
28	24	155	27	229	19	77
29	25	174	23	175	21	87
30	26	172	22	201	18	59

**Tablo 3.11.** Üçüncü dönem Akgöl-Paradeniz'den alınan örneklere ait boy ve ağırlık bilgileri

No	Levrek		Çipura		Kefal	
	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)
1	34	441	28	393	27	135
2	34	426	25	320	23	103
3	30	319	26	396	25	105
4	33	381	26	345	20	77
5	37	558	28	429	26	133
6	35	453	26	391	26	137
7	32	346	25	347	24	119
8	34	437	27	389	20	58
9	32	380	26	355	22	95
10	30	316	26	377	23	107
11	34	419	25	295	24	102
12	31	333	26	377	23	112
13	31	321	25	359	24	102
14	32	352	25	327	24	118
15	33	355	25	286	26	133
16	37	555	27	311	27	132
17	33	410	26	352	20	72
18	36	554	28	393	21	64
19	35	541	26	262	23	96
20	33	377	25	326	17	37
21	23	126	26	381	22	104
22	31	340	26	356	25	123
23	35	475	26	316	21	67
24	31	354	24	295	24	118
25	32	384	25	325	17	49
26	27	280	26	371	20	63
27	25	235	27	399	18	48
28	20	175	26	338	18	61
29	19	170	26	335	20	61
30	28	265	26	409	22	82

**Tablo 3.12.** Dördüncü dönem Beymelek'ten alınan örneklere ait boy ve ağırlık bilgileri

No	Levrek		Çipura		Kefal	
	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)
1	36	550	33	685	33	340
2	34	455	30	455	34	400
3	32	346	29	370	35	385
4	33	437	29	405	42	610
5	32	380	30	380	37	480
6	31	316	33	710	31	310
7	34	440	26	290	43	475
8	35	420	25	240	30	345
9	30	325	29	360	32	365
10	33	365	25	245	28	255
11	38	555	21	120	32	300
12	33	378	22	155	34	375
13	23	133	29	350	29	265
14	32	340	26	240	31	285
15	36	475	26	220	37	510
16	31	354	26	260	39	480
17	32	384	31	435	40	570
18	26	280	26	250	29	260
19	25	230	32	480	33	335
20	21	170	26	225	27	260
21	19	170	27	360	32	395
22	28	245	30	420	35	385
23	34	550	23	155	34	420
24	36	545	22	150	30	290
25	33	375	22	160	31	360
26	23	166	19	105	33	490
27	31	340	20	125	32	385
28	35	475	21	155	35	400
29	32	354	21	145	32	395
30	32	384	21	130	31	370

**Tablo 3.13.** Dördüncü dönem Akyatan'dan alınan örneklere ait boy ve ağırlık bilgileri

No	Levrek		Çipura		Kefal	
	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)
1	28	235	18	90	39	590
2	29	285	18	90	42	780
3	28	255	20	115	39	635
4	29	255	18	95	43	745
5	30	270	19	110	35	485
6	31	315	17	90	42	625
7	30	285	19	115	39	595
8	29	290	20	115	38	505
9	29	230	19	105	44	875
10	28	260	21	135	46	905
11	31	305	21	130	42	800
12	23	140	18	105	38	500
13	29	240	17	90	36	420
14	24	135	17	75	39	585
15	22	110	18	85	43	715
16	27	175	17	80	41	625
17	24	135	15	65	42	645
18	26	165	17	90	42	735
19	22	105	18	120	40	635
20	26	175	19	95	35	420
21	24	135	18	90	11	120
22	24	140	19	105	43	640
23	25	135	17	85	35	445
24	24	140	21	130	35	410
25	23	125	16	70	40	560
26	27	165	17	85	43	765
27	22	120	17	75	40	615
28	24	135	10	45	42	635
29	23	120	17	85	40	600
30	23	120	17	80	38	570

**Tablo 3.14.** Dördüncü dönem Akgöl-Paradeniz'den alınan örneklere ait boy ve ağırlık bilgileri

No	Levrek		Çipura		Kefal	
	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	Ağırlık (gr)
1	29	225	27	395	31	100
2	39	660	27	325	23	110
3	34	415	26	345	19	55
4	7	65	26	320	24	105
5	34	345	26	320	17	45
6	33	425	25	330	21	85
7	30	365	29	405	19	65
8	8	80	28	360	23	110
9	37	575	27	380	20	65
10	32	310	27	395	22	95
11	40	665	26	315	21	85
12	11	110	27	355	13	40
13	37	455	25	45	19	60
14	37	570	9	95	22	90
15	37	475	27	365	21	80
16	32	360	26	360	20	65
17	30	240	26	315	19	55
18	33	415	27	355	21	80
19	32	390	26	350	19	60
20	33	390	26	335	19	65
21	34	425	11	105	18	50
22	10	85	27	330	19	60
23	33	385	27	320	18	50
24	33	410	27	36	18	50
25	36	385	27	400	19	60
26	31	270	26	335	18	45
27	30	305	26	330	20	80
28	31	280	27	390	19	55
29	33	350	26	315	18	55
30	34	475	26	300	18	55

### 3.1.2. Örnekleme Dönemlerine Göre Lagünlerin Su Sıcaklıkları

Örnekleme, 2021 ve 2022 yıllarında kış ve yaz olmak üzere dört dönem halinde gerçekleştirildi. Lagünlerin (Beymelek, Akyatan ve Akgöl-Paradeniz) ortalama su sıcaklıkları, birinci örnekleme döneminde (Mart, 2021) 17 °C, ikinci örnekleme (Eylül, 2021) döneminde 26.3 °C, üçüncü örnekleme (Şubat, 2022) döneminde 16.3 °C, dördüncü örnekleme (Eylül, 2022) döneminde ise 27.3 °C olarak ölçüldü (Tablo 3.15).

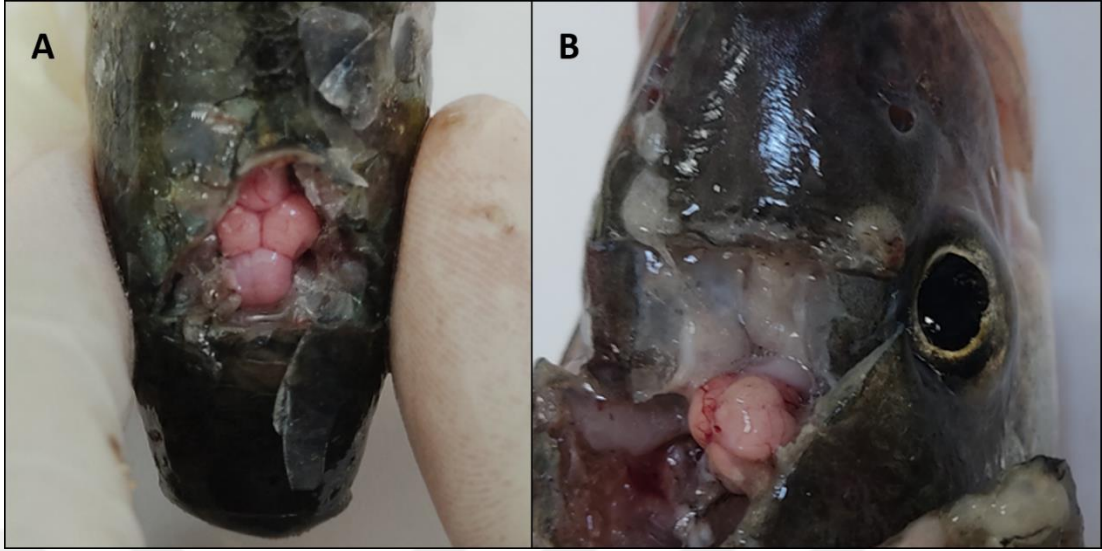
**Tablo 3.15.** Dönemlere göre lagünlerin su sıcaklıkları.

Dönem	Lokasyon	Lagün Su Sıcaklığı (°C)
1	Antalya Beymelek Lagünü	17
	Adana Akyatan Lagünü	18
	Mersin Akgöl-Paradeniz Lagünü	16
2	Antalya Beymelek Lagünü	27
	Adana Akyatan Lagünü	27
	Mersin Akgöl-Paradeniz Lagünü	25
3	Antalya Beymelek Lagünü	16
	Adana Akyatan Lagünü	16
	Mersin Akgöl-Paradeniz Lagünü	17
4	Antalya Beymelek Lagünü	26
	Adana Akyatan Lagünü	28
	Mersin Akgöl-Paradeniz Lagünü	28

### 3.1.3. Makroskobik Muayene Bulguları

Laboratuvara getirilen balıkların deri, yüzgeç ve solungaçları dış bakı ile kontrol edildi. Herhangi bir yaralanma, nekroz ve hemorajik bir görüntü tespit edilmedi. İnceleme sonunda herhangi bir patolojik bulgu tespit edilemeyen örneklerin

beyin ve gözleri alınarak, incelenmek üzere steril petri kutularına aktarıldı. (Şekil 3.1).



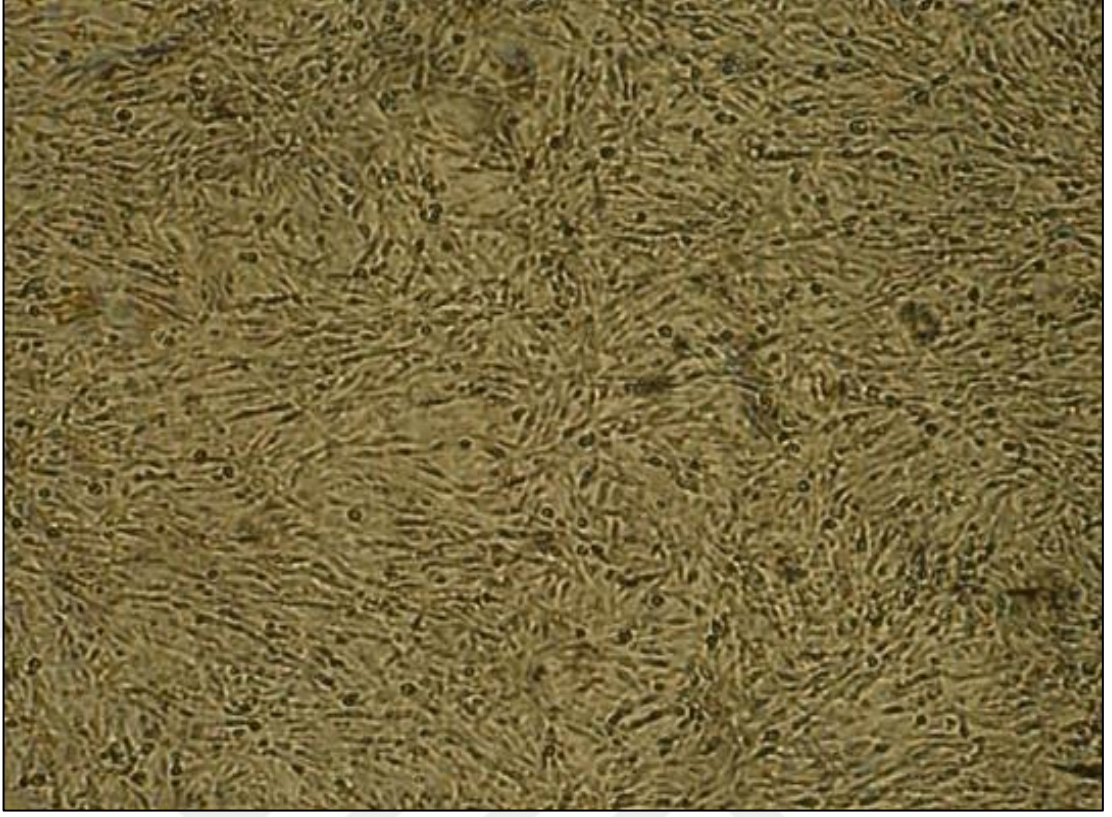
Şekil 3.1. Kefal balığına ait beyin (A-B) ve gözde (B) yapılan makroskobik muayene.

### 3.2. Hücre Kültürü

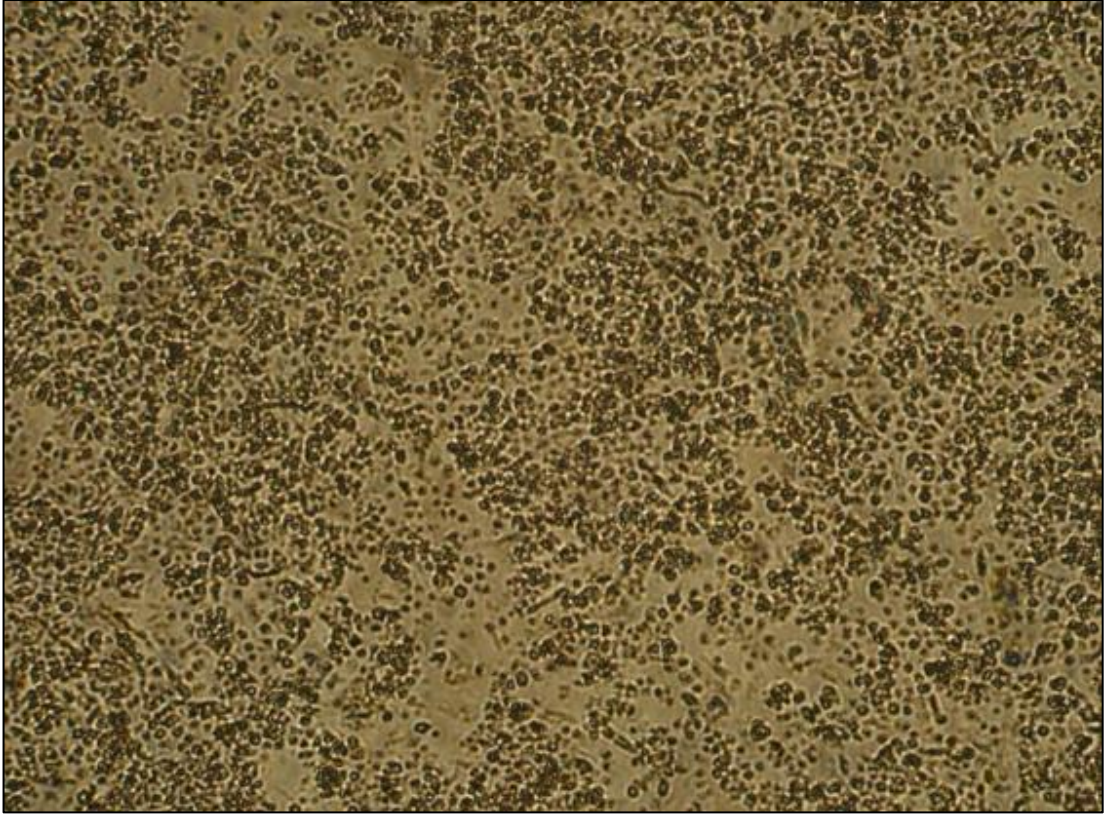
2.2.6'da belirtildiği gibi 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü flaskında SSN-1 hücreleri monolayer olarak üretildi. Çalışmada, RT-qPCR testinde pozitif kontrol olarak kullanılacak olan referans betanodavirus (475/198) suşu kullanıldı.

### 3.3. Referans Betanodavirusun Üretilmesi

Hücre kültürü tabletlerinde, inokulasyonu takip eden 5. günde vakuolizasyon ve lizis ile seyreden CPE oluşumu tespit edildi. Yedinci günün sonunda hücrelerde % 80 oranında CPE belirlendi (Şekil 3.3). Hücre kontrol olarak ise SSN-1 hücreleri kullanıldı (Şekil 3.2). Elde edilen hücre virus süspansiyonunun santrifüjünü takiben, süpernatant 1 ml'lik cryoviallere porsiyonlandı ve titresi belirlenerek kullanılıncaya kadar -80 °C'da stoklandı.



**Şekil 3.2.** SSN-1 hücre kültürü kontrol.



**Şekil 3.3.** Referans betanodavirusun (475/198) SSN-1 hücrelerine inokulasyonunu takiben 7. günde oluşan CPE görüntüsü.

### 3.3.1. Referans Betanodavirusun Titresi

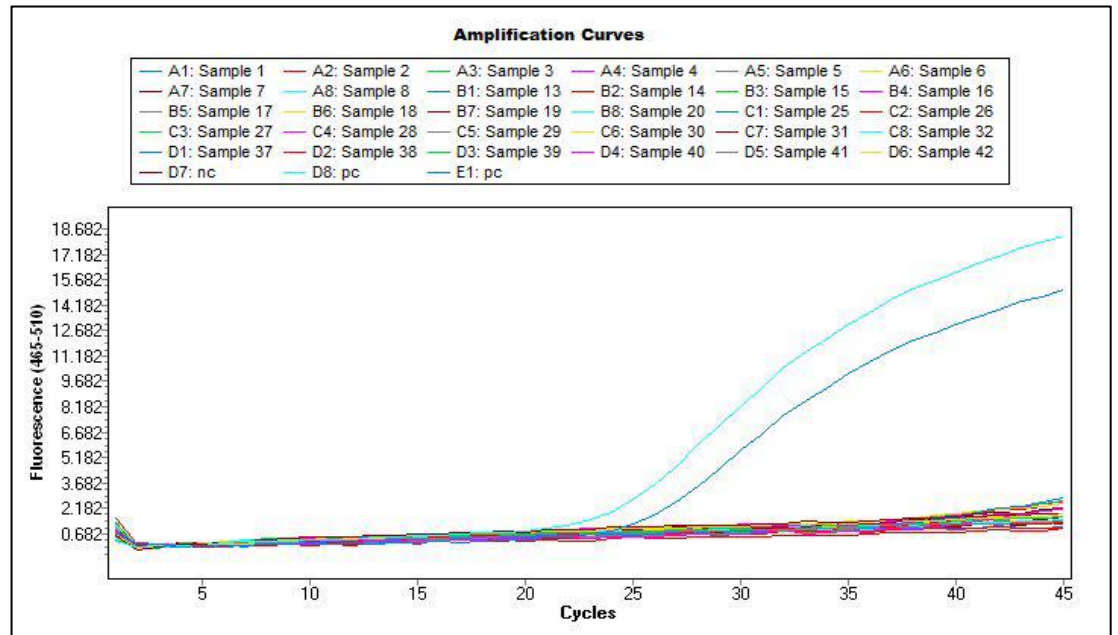
Çalışmada RT-qPCR testinde pozitif kontrol olarak kullanılan referans betanodavirusun titresi; Spearman-Kärber yöntemiyle yapılan değerlendirme sonucunda  $DKID_{50} 10^{-6}$  olarak belirlendi. Titresi belirlenen stok virus-hücre süspansiyonu RT-qPCR testlerinde kullanılmak üzere  $-20^{\circ}C$ 'da ve  $-80^{\circ}C$ 'da stoklandı.

### 3.4. Saha Örneklerinde Betanodavirus Varlığı

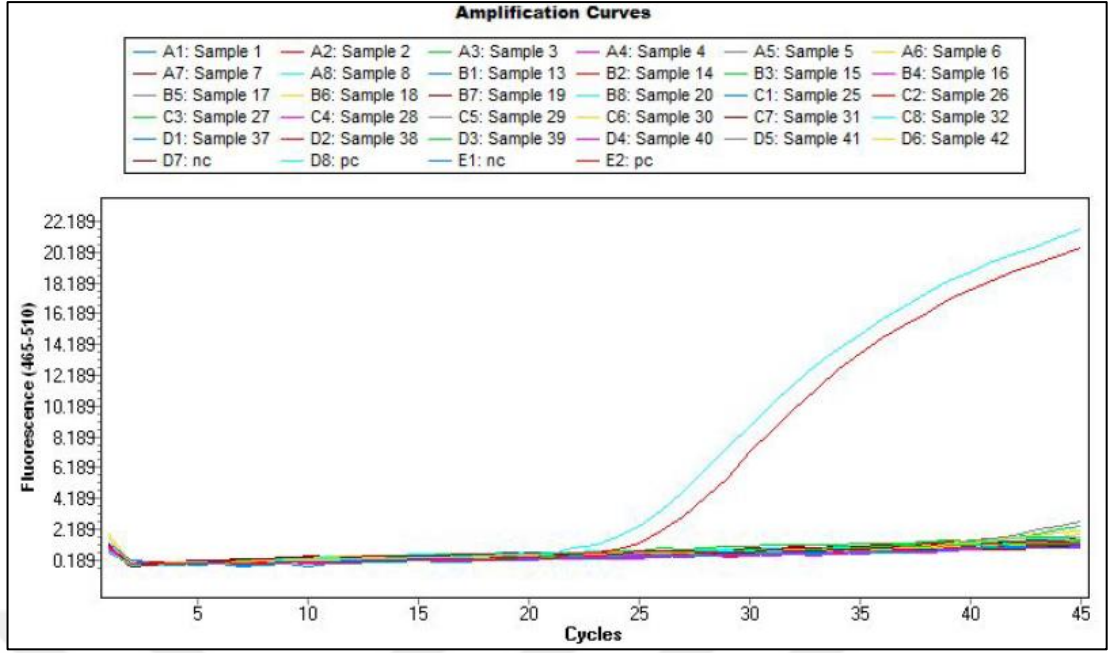
#### 3.4.1. RT- qPCR Sonuçları

Bu amaçla 3.4.1'de belirtildiği gibi ekstraksiyon işlemi tamamlanan ekstraktlara, RT-qPCR uygulandı. Örneklerin karışmasını ve olası bir kontaminasyonu engellemek için 30 örnekten oluşan her bir gruba ayrı ayrı RT-qPCR yapıldı ve sonuçlar değerlendirildi (Şekil 3.3, 3.4 ve 3.5).

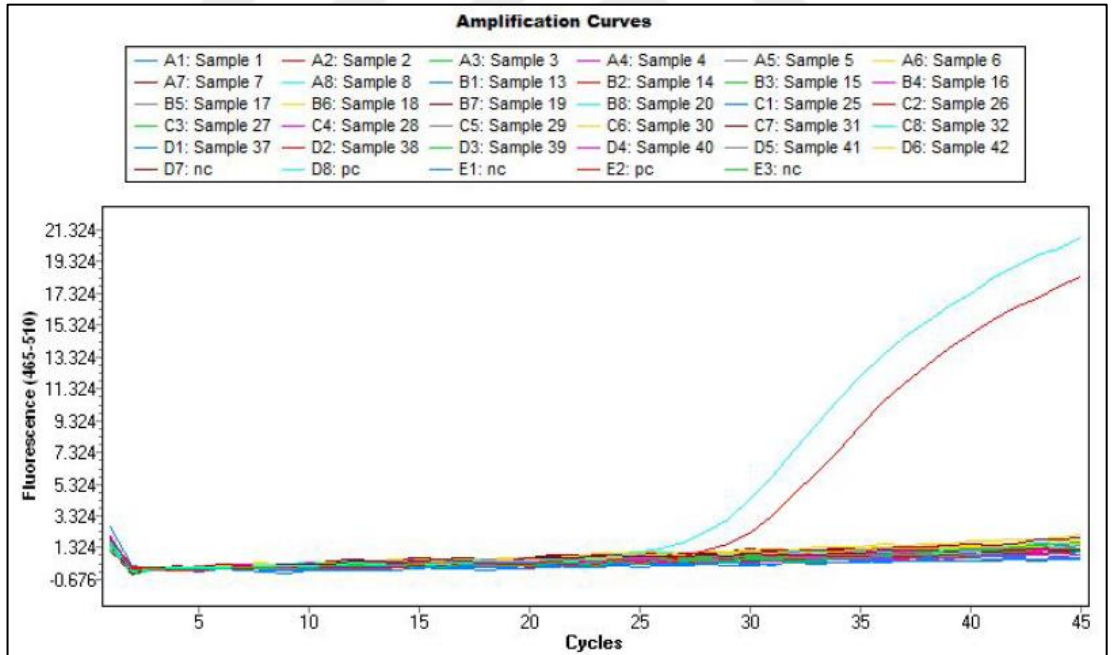
Her bir test grubu için ekstraksiyon pleytine konulan pozitif kontrollerin ct değerleri 23.85-30.65 arasında bulunurken, RT-qPCR işlemi için konulan pozitif kontrollerin ct değerleri ise 24.90-31.10 arasında bulundu. RT-qPCR ile incelemesi yapılan her üç türe (Levrek, Çipura ve Kefal) ait toplam 1080 adet balıkta betanodavirus genomu tespit edilmedi (Tablo 3.16).



Şekil 3.3. RT- qPCR testi sonucunda birinci dönem levrek örnekleri (A1-D6), negatif kontrol (D7) ve pozitif kontrollerine (D8-ekstraksiyon pozitif kontrol ve E1-PCR pozitif kontrol) ait amplifikasyon eğrileri (Pozitif Kontrol Ct Değerleri: D8: 23.85, E1: 25.03).



**Şekil 3.4.** RT- qPCR testi sonucunda ikinci dönem levrek örnekleri (A1-D6), negatif kontrol (D7 ve E1) ve pozitif kontrollere (D8-ekstraksiyon pozitif kontrol ve E2-PCR pozitif kontrol) ait amplifikasyon eğrileri (Pozitif Kontrol Ct Değerleri: D8: 24.25, E2: 25.40).



**Şekil 3.5.** RT- qPCR testi sonucunda üçüncü dönem levrek örnekleri (A1-D6), negatif kontrol (D7, E1 ve E3) ve pozitif kontrollere (D8-ekstraksiyon pozitif kontrol ve E2-PCR pozitif kontrol) ait amplifikasyon eğrileri (Pozitif Kontrol Ct Değerleri: D8: 27.60, E2: 28.17).

**Tablo 3.16.** Örnekleme yapılan lagünler, balık türleri, sayı, tarih ve RT- qPCR sonuçları.

Dönem	Örnekleme Yeri	Tür	Sayı	Tarih	RT- qPCR Sonuçları
1	Antalya Beymelek Lagünü	Levrek	30	16.03.2021	Negatif
		Çipura	30		
		Kefal	30		
	Adana Akyatan Lagünü	Levrek	30	22.03.2021	Negatif
		Çipura	30		
		Kefal	30		
	Mersin Akgöl-Paradeniz Lagünü	Levrek	30	22.03.2021	Negatif
		Çipura	30		
		Kefal	30		
2	Antalya Beymelek Lagünü	Levrek	30	08.09.2021	Negatif
		Çipura	30		
		Kefal	30		
	Adana Akyatan Lagünü	Levrek	30	13.09.2021	Negatif
		Çipura	30		
		Kefal	30		
	Mersin Akgöl-Paradeniz Lagünü	Levrek	30	13.09.2021	Negatif
		Çipura	30		
		Kefal	30		
3	Antalya Beymelek Lagünü	Levrek	30	01.02.2022	Negatif
		Çipura	30		
		Kefal	30		
	Adana Akyatan Lagünü	Levrek	30	08.02.2022	Negatif
		Çipura	30		
		Kefal	30		
	Mersin Akgöl-Paradeniz Lagünü	Levrek	30	08.02.2022	Negatif
		Çipura	30		
		Kefal	30		
4	Antalya Beymelek Lagünü	Levrek	30	15.09.2022	Negatif
		Çipura	30		
		Kefal	30		
	Adana Akyatan Lagünü	Levrek	30	19.09.2022	Negatif
		Çipura	30		
		Kefal	30		
	Mersin Akgöl-Paradeniz Lagünü	Levrek	30	19.09.2022	Negatif
		Çipura	30		
		Kefal	30		

### 3.5. Saha Örneklerinden Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu

Bu amaçla 2.2.6’da belirtildiği gibi balıkların beyin ve gözleri alınarak inokulum oluşturuldu. Bölüm 3.4’te belirtildiği gibi elde edilen inokulumlara RNA ekstraksiyonu ve ardından viral genom varlığını belirlemek için RT-qPCR uygulandı. Ancak incelemesi yapılan 1080 örneğin hiçbirinde VNN virusunun genomu tespit edilmedi. Bu sebeple saha örneklerinden hücre kültüründe virus izolasyonu çalışması yapılmadı.

#### 4. TARTIŞMA

Viral Nervöz Nekrozis Virus'u, özellikle deniz balıkları arasında geniş bir konakçı yelpazesine sahip olan ve doğal hayatta yaşayan birçok balık türünde enfeksiyon oluşturan önemli bir balık patojenidir (Sitar ve ark 2021, Sánchez ve ark 2022, Vázquez-Salgado ve ark 2023). Enfeksiyon, özellikle Asya ve Avrupa ülkeleri başta olmak üzere dünyada su ürünleri yetiştiriciliği yapılan birçok çiftlikte büyük bir sorun haline gelmiştir (Sánchez ve ark 2022, Zrnčić ve ark 2022). Betanodavirus enfeksiyonlarından deniz balıkları arasında en çok levrek, çipura ve grouper türlerinin etkilendiği bildirilmiş olmasına rağmen, 120'den fazla balık türünden de tespit edilmesi, etkenin dünyada geniş bir coğrafyada yayılım gösterdiğini ortaya koymaktadır (Toffan ve ark 2017, Yang ve ark 2022). Betanodavirusların varlığı Akdeniz ülkelerinde sık sık rapor edilmekte ve sektörü giderek daha fazla tehdit eder hale gelmektedir (Cherif ve ark 2021, Biasini ve ark 2022, Sánchez ve ark 2022, Kaplan ve ark 2023, Valero ve Cuesta 2023). Betanodaviruslar soğuk ve ılıman iklim sularında yaşayan birçok balık türünde enfeksiyona neden olabilmektedir (Costa ve Thompson 2016, Bandín ve Souto 2020). Virus özellikle larval ve juvenil dönem balıkları etkilemekle birlikte, yetişkin balıklarda da enfeksiyona neden olur (Munday ve ark 2002, Padrós ve ark 2022). Öte yandan virusun segmentli genomu sahip olması nedeniyle, genotipler arası gen değişimleri sonucunda oluşan reassortant genotipler (RGNNV/SJNNV, SJNNV/RGNNV) farklı su sıcaklıklarına adapte olarak başka balık türlerini de etkileyebilmektedir (Volpe ve ark 2020, Toffan ve ark 2021, Biasini ve ark 2022, Valero ve Cuesta 2023). Ayrıca kemikli balıkların yanı sıra yumuşakçalar, artemia, rotifer gibi larval dönem beslenmesinde esansiyel olan canlı yemlerin de virus rezervuarı olması, bulaşma hızını artırmakta ve hastalıkla mücadeleyi zorlaştırmaktadır (Hick ve ark 2011, Vázquez-Salgado ve ark 2020, Vázquez-Salgado ve ark 2022). Virusun nörotropizm özelliğinden dolayı balıklarda MSS en çok etkilenen bölgelerdir (Mori ve ark 1992, Zorriehzahra ve ark 2020, Johnstone ve ark 2022). Virus ile enfekte sinir hücrelerinde vakuolizasyon odaklarının oluştuğu ve enfekte hücrelerin görevlerini yerine getiremez hale geldiği bildirilmektedir (Dalla Valle ve ark 2000, Johnstone ve ark 2022, Fouzi ve Sakazamary 2023).

Dünya'da su ürünleri sektörü çok hızlı gelişim göstermektedir (FAO 2022). FAO (2022) yayınladığı raporda, Türkiye'nin levrek ve çipura üretiminde öncü bir ülke olduğunu ve balık ihracatında önemli bir konumda bulunduğunu belirtmiştir.

TUIK (2021), 2020 yılında Türkiye’de levrek üretiminin 149 bin ton, çipura üretiminin ise 110 bin ton olduğunu bildirmiştir. Yapılan birçok çalışmada (Castric ve ark 2001, Skliris ve ark 2001, Berzak ve ark 2019, Savoca ve ark 2021, Sitar ve ark 2021, Vázquez-Salgado ve ark 2023) levrek ve çipuraların betanodavirüslerle duyarlı olduğu ve enfeksiyonun sektörde önemli ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmektedir. Sitar ve ark (2021) Slovenya’da denizde kültür şartlarında yetiştiriciliği yapılan anormal yüzme davranışları gösteren yetişkin (125-870 gr) levreklerde yaptıkları bir araştırmada, örneklenen balıkların beyin ve gözlerinde RT-qPCR ile betanodavirus genom varlığını tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Chérif ve ark (2021), Tunus’da deniz kıyısında levrek ve çipura yetiştiriciliği yapılan bir tesiste ölüm vakalarının artması üzerine bir araştırma yapmışlardır. Çalışmada (2021), örnekledikleri 134 levrekten 55’inde ve 160 çipuradan 63’ünde RT-qPCR ile betanodavirus genomunu tespit etmişlerdir. Türkiye’de levrek ve çipura üretimi yapılan kuluçkahane ve çiftliklerde betanodavirus varlığına yönelik birçok araştırma (Özkan Özyer ve ark 2014, Kalaycı ve ark 2016, Kaplan ve Karaoğlu 2021, Kaplan ve ark 2021, Kaplan ve ark 2022a) yapılmıştır. Kaplan ve Karaoğlu (2021), Türkiye’de faaliyet gösteren 16 kuluçkahane ve 20 yetiştiricilik tesisinde, farklı yaş (larva, fingerling, juvenil) gruplarından örneklenen levreklerde betanodavirus varlığını araştırmışlardır. Çalışmada (2021), 1 kuluçkahane ve 1 yetiştirme tesisinde bulunan fingerling boy levreklerde betanodavirus genomunu tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Kaplan ve ark (2021), Karadeniz bölgesindeki çiftliklerde, 2016-2019 yılları arasında denizde kafeslerde yetiştirilen levreklerde betanodavirus genomunu RT-qPCR ile tespit ettiklerini ifade etmişlerdir. Kaplan ve ark (2022a) Ege bölgesinde yaptıkları bir çalışmada, klinik belirti göstermeyen çipuralarda RT-qPCR ile betanodavirus genom varlığını tespit etmişler ve yaptıkları filogenetik analiz sonucunda virusun RGNNV/SJNNV reasortant genotipi olduğunu bildirmişlerdir. Levrek ve çipura’ya ilave olarak ülkemizde tüketimi yüksek sayılan bir diğer tür de kefal balıklarıdır. Yapılan çalışmalarda (Ucko ve ark 2004, Hassantabar ve ark 2021) kefal balıklarının da betanodavirüsle duyarlı olduğu ve virusun taşıyıcısı olduğu ifade edilmiştir. Cha ve ark (2007) Güney Kore’de yaptıkları bir çalışmada, kültürü yapılan kefal (*Mugil cephalus*) balıklarında betanodavirus tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Ucko ve ark (2004) İsrail’de hem Kızıldeniz hem de Akdeniz sahil kıyısında kafeslerde kültürü yapılan kefal balıklarında yaptıkları bir araştırmada betanodavirus varlığını tespit etmişlerdir. Kefal balıklarının Türkiye’de her ne kadar akuakültür ortamında yetiştiriciliği

yapılmasa da potansiyel olarak hem denizlerimizde var olması hem de lagünlerimizde baskın olarak bulunan bir tür olması nedeniyle virusun varlığı açısından araştırılması önem arz etmektedir. Bu durum, anaç temini yapılan lagünlerden duyarlı balık türleri üzerinde daha fazla betanodavirus araştırması yapma ihtiyacı doğurmaktadır. Bu sebeple tez çalışmasında belirlenen lagünlerde en çok rastlanan balık türleri (levrek, çipura ve kefal)'nde betanodavirus varlığı araştırıldı.

Kültür şartlarında yetiştiriciliği yapılan balıkların yanısıra doğal hayatta yaşayan balıklarda (Ucko ve ark 2004, Moreno ve ark 2014, Kim ve ark 2018, Johnstone ve ark 2022, Kaplan ve ark 2023, Vázquez-Salgado ve ark 2023) da virusun tespit edildiği bildirilmiştir. Moreno ve ark (2014), 2010-2011 yıllarında İspanya'nın İber yarımadasında bulunan Cádiz Körfezi'nden örnekledikleri çipura (*pagellus acarne*), mercan (*pagellus erythrinus*) ve barbun (*mullus barbatus*) türü balıklarda betanodavirus genom varlığını ortaya koymuşlardır. Vázquez-Salgado ve ark (2023), 2019-2022 yıllarında İspanya'da denizden örnekledikleri; levrek (*Dicentrarchus labrax*) (2/67), sardalya (*sardina pilchardus*) (7/79), mezigit (*Micromesistius poutassou*) (3/150), sargoz (*diplodus sargus*) (1/12) ve istavrit (*trachurus trachurus*) (3/47) türü balıklardan betanodavirus genomunun varlığını tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Kaplan ve ark (2023), Hatay-Antalya arasında Akdeniz kıyı şeridinden 27 farklı türden 400 balık örneğinde betanodavirus varlığına yönelik bir araştırma yapmışlardır. Çalışmada (2023), zargana ve barbun türlerinde betanodavirus genom varlığını tespit ettiklerini ifade etmişlerdir. Kaplan ve ark (2022b), 2016-2020 yılları arasında Kuzey Ege ve Marmara bölgesinde çift kabuklu yumuşakçaların doğal yataklarından örnekledikleri kum midyesi (*Ruditapes decussatus*) ve kara midye (*Mytilus galloprovincialis*)'de betanodavirus genom varlığını belirleyemediklerini bildirmişlerdir. Türkiye'de doğal balık türlerinde yapılan betanodavirus araştırmaları (Kaplan ve ark 2022b, Kaplan ve ark 2023) henüz yeterli düzeyde olmadığı düşünülmektedir. Bu çalışma ile lagünlerde bulunan levrek, çipura ve kefallerde araştırma yapılarak doğal balık popülasyonlarında betanodavirus varlığına yönelik mevcut durum ortaya konuldu.

Balıkların yaşadığı en doğal ortamlar kuşkusuz ki denizler, akarsular, göl ve göletlerdir. Bu alanlara ilave olarak denizler ile bağlantısı olan lagünler de balıklar için doğal bir yaşam alanıdır. Zengin biyoçeşitliliği ile balıkların önemli yaşam alanları arasında yer alan lagünler, denizde yaşayan bazı balık türleri (levrek, çipura, kefal,

minekop, mırmır, yengeç vs)'ne ev sahipliği yapmaktadır (Uysal ve ark 2018). Türkiye'de Akdeniz bölgesinde büyük-küçük, aktif olan ve olmayan birçok lagün bulunmaktadır. Bunlar arasında Adana'da Akyatan, Mersin'de Akgöl-Paradeniz ve Antalya'da Beymelek lagünleri aktif olarak balıkçılığın yapıldığı büyük lagünlerdir. Levrek, çipura ve kefal gibi balık türlerine bu lagünlerde sıklıkla rastlandığı bildirilmektedir (Keser ve ark 2011, Türkmen ve ark 2012). Ayrıca gerek özel sektör gerekse kamu tarafından kültüre alınan balık türleri (levrek ve çipura)'nin damızlık adayları, bu lagünlerden ıslah projeleri kapsamında sağlanabilmektedir (TAGEM 2021). Bu sebeple bu çalışmada, Türkiye'nin Akdeniz bölgesinde yer alan bu lagünlerde (Akyatan, Akgöl-Paradeniz ve Beymelek) en sık rastlanan balık türleri (Levrek, Çipura ve Kefal)'nde VNN virusunun varlığı araştırıldı.

Virusun beyin, omurilik ve göze ait sinir dokulardan ziyade non-nöral dokulardan da (deri epiteli, solungaç, bağırsak, karaciğer, kalp, böbrek ve gonad) izole edildiği bildirilmiştir (Valero ve ark 2015, Souto ve ark 2018, Chen ve ark 2022). Taha ve ark (2020), Mısır'da kitlesel balık ölümlerinin görüldüğü tilapya (*Oreochromis niloticus*) yetiştirme çiftliklerinde yaptıkları araştırmada ölen balıkların beyin, göz ve ovaryumlarında betanodavirus viral genomunu tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Valero ve ark (2015), SSN-1 hücre kültüründe ürettikleri betanodavirusu (411/96 RGNNV suşu) levrek ve çipuralara IM olarak uygulayarak deneysel bir enfeksiyon oluşturmuşlardır. Çalışma (2015) sonunda, enfeksiyon oluşturulan balıkların gonadal dokularından alınan örneklerde betanodavirus genomunun tespit edildiği bildirilmiştir. Virusun birçok balık türünde beyin ve göz gibi organların haricinde farklı organ ve dokulardan tespit edilmiş olması, enfeksiyonun birçok yolla bulaştığını ortaya koymaktadır (Valero ve ark 2015, Taha ve ark 2020). Bu çalışmada belirlenen lagünlerde bulunan levrek, çipura ve kefal balıklarında türler arasında ya da su ve suda bulunan birçok biyolojik canlı aracılığıyla olası bir bulaş olabileceği düşünülerek betanodavirus varlığı araştırıldı.

Betanodavirusların konakçıda etkili olmasında su sıcaklığının önemi büyüktür (Hata ve ark 2010, Souto ve ark 2019). Yapılan deneysel çalışmalarda (Iwamoto ve ark 2000, Maltese ve Bovo 2007, Toffan ve ark 2016) farklı genotiplere sahip betanodavirusların, 15-30 °C su sıcaklığına sahip sulardaki balıklarda enfeksiyon oluşturduğu bildirilmiştir (Maltese ve Bovo 2007, Toffan ve ark 2016, Bandín ve Souto 2020). Soğuk iklim şartlarındaki sularda yaşayan balıklarda BFNNV, ılıman ve

sıcak iklim sularında yaşayanlarda ise SJNNV, RGNNV ve SJNNV/RGNNV reassortant genotiplerinin enfeksiyona neden olduğu ifade edilmiştir (Iwamoto ve ark 2000, Souto ve ark 2015, Bandín ve Souto 2020). Bu çalışmada Akdeniz bölgesinde bulunan Akyatan, Akgöl-Paradeniz ve Beymelek lagünlerinde düşük (15-20<sup>0</sup>C) ve yüksek (25<sup>0</sup>C ve üzeri) su sıcaklığına sahip dönemlerde levrek, çipura ve kefal balıklarında betanodavirus varlığı ilk kez araştırıldı. Çalışmada lagünlerden örnekleme yapılırken virusun tüm genotiplerinin tespit edilebileceği düşük ve yüksek su sıcaklıklarının olduğu kış ve yaz dönemleri tercih edildi. Birinci (kış) örnekleme döneminde 3 lagünün (Beymelek, Akyatan ve Akgöl-Paradeniz) ortalama su sıcaklığı 17<sup>0</sup>C, ikinci (yaz) dönemde 26<sup>0</sup>C, üçüncü (kış) dönemde 16<sup>0</sup>C ve dördüncü (yaz) dönemde ise aynı lagünlerin ortalama su sıcaklıkları 27<sup>0</sup>C olarak ölçüldü. Kaplan ve ark (2023) Akdeniz’de Antalya ve Hatay arasında farklı lokasyonlarda bulunan doğal türlerden zargana (*Belone belone*) ve barbun (*Mullus barbatus*) balıklarında RT-qPCR ile betanodavirus genomunun varlığını ortaya koymuşlardır. Kaplan ve ark (2023)’nın yaptığı çalışma, Akdeniz’in Antalya ve Hatay arasında bulunan farklı lokasyonlarından örneklenen balıklar ile yapılmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada örnekleme yapılan lagünler ile Kaplan ve ark (2023)’nin örnekleme yaptıkları yer arasında bölgesel bir ilişki bulunmaktadır. Ayrıca Kaplan ve ark (2023), örnekleme yaptıkları dönemlerde deniz su sıcaklığının 17-30 <sup>0</sup>C arasında olduğunu ve zargana ile barbun balıklarında virusun tespit edildiği dönemdeki su sıcaklığının ise sırasıyla 25<sup>0</sup>C ve 28<sup>0</sup>C olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da örnekleme, lagün su sıcaklıklarının 17-28<sup>0</sup>C arasında olduğu dönemlerde yapılmıştır. Daha önce lagünlerde bu tür bir çalışma yapılmadığından lagünlere biyolojik çevre açısından ve topografik olarak en yakın olan denizde yapılan çalışma (Kaplan ve ark 2023) ile kıyaslama yapılmıştır. Lagünler ile deniz bağlantısını sağlayan lagün boğazlarından balıklar her iki tarafa doğru göç edebilmektedirler (Katselis ve ark 2007). Bu lagün boğazlarında insan yapımı kuzuluk diye adlandırılan ahşap ve demir malzemelerden yapılmış sabit bariyer tuzaklar yer almaktadır. Projede yer alan lagünler deniz seviyesinden daha yüksekte (0-1.5m) bulunduğu denize doğru bir su akışı şekillenir. Fakat özellikle fırtınalı kış aylarında deniz seviyesinin yükselmesine bağlı olarak denizden lagünlere doğru bir akıntı oluşabilmektedir (Keser 2011). Hava koşullarından ve bazı predatör balıklardan korunma amacıyla denizde bulunan balıklar lagünlere giriş yapmakta ve ortama adaptasyon sağlayarak lagünlerde yaşamlarına devam etmektedirler. Gerek deniz seviyesinin yükselmesi gerekse lagünlerde insan yapımı sabit bariyer tuzakların

kurulması sebebiyle lagünlerin sınırlı bir alanının olması ve mevsimin bazı dönemlerinde balıklara ev sahipliği yapması gibi nedenlerle tür çeşitliliği denizdeki gibi fazla değildir (Katselis ve ark 2007). Bu bilgiler ışığında denizlerde doğal şartlarda bulunan ve kafeslerde yetiştiricilik yapılan balıklardan lagünlere kıyasla virusun tespit edilebilmesi ihtimali daha yüksektir. Virusun birçok balık türünde tespit edilmiş olması, bulaşma yollarının fazlalığı ve lagünlerin denizlere kıyasla daha az balık türü barındırması nedeniyle bu çalışmada betanodavirus pozitif balık tespit edilemediği düşünülmektedir.

Betanodavirusların daha çok Asya ve Akdeniz ülkelerinde faaliyet gösteren deniz kafes balık yetiştiriciliği yapılan balıklardan sıklıkla tespit edildiği bildirilmektedir (Toffan ve ark 2017, Chérif ve ark 2021, Vázquez Salgado ve ark 2023, Kaplan ve ark 2023). Yapılan araştırmalara (Athanasopoulou ve ark 2003, Giacopello ve ark 2013, Bitchava ve ark 2019, Kaplan ve ark 2022a, Kaplan ve ark 2023) göre betanodavirus enfeksiyonları Akdeniz ülkelerinde sıklıkla tespit edilmektedir. Gerek özel sektör gerekse kamu tarafından ıslah amaçlı damızlık adayı olarak kullanılan levrek ve çipuralar Akdeniz bölgesinde bulunan lagünlerden temin edilebilmektedir. Bu doğrultuda TAGEM (2021) tarafından yürütülen güdümlü bir ıslah projesi (TAGEM/HAYSÜD/G/21/AG/P2/2732) de bulunmaktadır. Bu durumda yetiştiriciliğe alınan balıkların sağlıklı damızlıklardan temin edilmesi için lagünlerde varsa betanodavirus varlığının ortaya konması büyük önem arz etmektedir. Yapılan araştırmalar (Souto ve ark 2015a, Moreno ve ark 2019, Toffan ve Panzarin 2020, Sitar ve ark 2021, Padrós ve ark 2022) sonucunda, betanodavirus enfeksiyonlarından en çok etkilenen balık türünün levrek olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada örnekleme levreklerle ilave olarak çipura ve kefal balıklarının da dahil edilmesinin sebebi, daha önce yapılan çalışmalar (Athanasopoulou ve ark 2003, Ucko ve ark 2004, Oliveira ve ark 2009, Toffan ve ark 2017, Hassantabar ve ark 2021, Savoca ve ark 2021, Kaplan ve ark 2022a)'da bu türlerde de virusun tespit edilmiş olmasıdır. Ayrıca Akdeniz bölgesinde bulunan bu lagünlerde hem çipura hem de kefal türlerinin baskın olarak bulunmasından dolayı bu türlerde de betanodavirus varlığının araştırılması amaçlandı.

Akdeniz ülkelerinde hem çiftlik hem de denizde doğal şartlarda yaşayan balıklarda betanodavirus tespit edilmiştir (Toffan ve ark 2017, Berzak ve ark 2019, Volpe ve ark 2020, Hassantabar ve ark 2021, Cherif ve ark 2021, Savoca ve ark 2021, Vázquez Salgado ve ark 2023, Kaplan ve ark 2023). Türkiye'de kuluçkahaneler ve

deniz kafes yetiştiriciliği yapılan tesislerde betanodavirus varlığına yönelik araştırmalar yürütülmüştür (Özkan Özyer ve ark 2014, Kalaycı ve ark 2016, Kaplan ve Karaoğlu 2021, Kaplan ve ark 2021, Kaplan ve ark 2022a). Ancak kamu ve özel sektör tarafından damızlık anaç balık temini yapılan Akdeniz bölgesi lagünlerinde bulunan balıklarda betanodavirus varlığı araştırılmamıştır. Dolayısıyla bahsi geçen lagünlerde doğal koşullarda yetişen bu türlerde betanodavirus ile ilgili herhangi bir veri bulunmamaktadır. Türkiye'nin Akdeniz bölgesinde bulunan lagünlerdeki levrek, çipura ve kefallerde RT-qPCR ile yapılan araştırma sonucunda, betanodavirus genom varlığı belirlenmedi. Böylece kamu ve özel sektöre damızlık anaç balık temin eden bölge lagünlerinin şu an için betanodavirustan ari olduğu ortaya konarak literatüre katkı sağlanmış oldu.

Betanodavirusların teşhisinde örneklenecek en uygun materyal, balıkların göz ve beyin organlarıdır (WOAH 2019). Ayrıca örneklenen balıkların boy durumları da teşhiste önemli bir parametredir. Bir cm ve altında boya sahip balıklar bütün olarak değerlendirilirken, 1-6 cm arasında olduğu durumlarda tüm kafa bölgesi alınmakta, 6 cm'den daha büyük balıklarda ise sadece göz ve beyin organlarının alınması gereklidir (WOAH 2019). WOA (2019), klinik semptom gösteren balıkların örneklemeğinde 5-10 adet balıktan alınan materyallerin birleştirilerek tek örnek kabul edileceğini, asemptomatik balıkların örneklemeğinde ise her bir balığın tek örnek olarak değerlendirilmesi gerektiğini bildirmiştir. Bu tez çalışmasında alınan tüm balıklar, 6 cm ve üzerinde olduğu için teşhis materyali olarak balıkların sadece göz ve beyinleri örneklendirilmiştir. Ayrıca örnekleme esnasında yapılan eksternal muayenede balıkların sağlıklı olduğu değerlendirilmiş ve laboratuvara getirildikten sonra yapılan makroskopik muayenede balıklarda herhangi bir makroskopik patolojik bulgu tespit edilmemiştir. Bu sebeple çalışmada örneklenen her bir balık bireysel olarak incelendi.

Betanodavirus enfeksiyonlarından korunmak için etkenin doğru ve olabilecek en hızlı şekilde teşhis edilebilmesi gereklidir. Etkenin ve oluşturduğu enfeksiyonun tanımlanmasında; klinik gözlemlerden, virusun hücre kültürlerinde izolasyonuna, histopatolojisine ve moleküler tanı yöntemlerine kadar birçok teşhis metodunun geliştirildiği bildirilmiştir (Iwamoto ve ark 2000, Dalla Valle ve ark 2005, Panzarin ve ark 2010, Doan ve ark 2017, Yang ve ark 2022). Mori ve ark (1992), Japonya'da kuluçkahanede yetiştirilen Kral balığı (*striped jack*) larvalarından aldıkları örneklerde betanodavirusu EM ile tespit ettiklerini ifade etmişlerdir. Nishizawa ve ark (1995),

Japonya'da klinik semptom gösteren kral balıkları (*striped jack*)'ndan aldıkları örneklerde RT-PCR ile betanodavirus genom varlığını belirlediklerini bildirmişlerdir. Dalla Valle ve ark (2005) farklı betanodavirus suşları ile yaptıkları çalışmada, RNA1 ve RNA2 geninin hedeflendiği RT-qPCR metodu geliştirdiklerini ifade etmişlerdir. Grove ve ark (2006) yaptıkları bir çalışmada, atlantik halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) balıklarında RT-qPCR ile betanodavirus genom varlığını tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Panzarin ve ark (2010), Asya ve Avrupa ülkelerinde betanodavirus tespit edilen farklı genotipe sahip izolatların kullanıldığı bir çalışmada, virusun RNA2 geninin hedeflendiği RT-qPCR metodu geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Ancak WOAHA (2019), geliştirilen bazı RT-qPCR metotları (Grove ve ark 2006, Hick ve Whittington 2010)'nın tüm betanodavirus genotiplerinin tespiti için uygun olmadığını, Panzarin ve ark (2010)'nın geliştirdiği RT-qPCR metodunun ise daha uygun olduğunu bildirmiştir. Bu sebeple bu çalışmada elde edilen tüm örneklerde, WOAHA (2019) tarafından önerilen Panzarin ve ark (2010)'nın geliştirdiği RT-qPCR ile betanodavirus genom varlığını araştırıldı. WOAHA (2019), VNNV'nin teşhisinde farklı teşhis yöntemlerinin uygulanabileceğini ve bu yöntemlerin her birinin kendi içinde avantaj ve dezavantajlarının bulunduğunu bildirmiştir (Bölüm 1.5.3 Tablo 1.4). Moleküler tekniklerin hızlı ve az maliyetli olması, düşük titrelerde hücre kültüründe üretilmeyen virusun tespit edilebilmesi, teşhis çalışmalarında moleküler teknikleri üstün kılmıştır (Panzarin ve ark 2010, Panzarin ve ark 2012, WOAHA 2019, Yang ve ark 2022). Tarihsel olarak bakıldığında ilk olarak hücre kültüründe virus izolasyonu, immunolojik teknikler ve son olarak da moleküler tanı yöntemleri ile teşhis çalışmaları giderek ivme kazanmıştır. Moleküler tekniklerin hücre kültüründe virus izolasyonu ve immunolojik metotlara kıyasla teşhis süresini kısaltması ve maliyetinin düşük olması sebebiyle teşhiste rutin kullanılan metot haline gelmiştir. WOAHA (2019), VNNV'nin teşhisinde elektron mikroskopisinin kullanılabileceğini, histopatolojik yöntemlerle hücrelerde meydana gelen patolojik değişikliklerin gösterilebileceğini, hücre kültüründe izolasyon çalışmalarının yapılabileceğini ve moleküler olarak RT-qPCR ile virusun genom varlığının tespit edilebileceğini bildirmiştir. Ancak WOAHA (2019), teşhis özgüllüğü, yöntem, fayda ve uygunluk açısından moleküler olarak RT-qPCR'ın diğer yöntemlere göre en uygun metot olduğunu bildirmiştir. Bu doğrultuda WOAHA (2019), şüpheli örneklerden virusun teşhisinde ilk olarak RT-qPCR ile genom varlığının ortaya konulmasını, ardından pozitif bulunan örneklerden hücre kültüründe virus izolasyonu çalışmalarının yapılabileceğini önermektedir.

VNNV'nin izolasyonunda, striped snakehead balıklarından köken alan SSN-1 hücreleri ve SSN-1'den klonlanan E-11 hücre hatları kullanılmaktadır (Iwamoto ve ark 2000, WOA 2019, Zorriehzahra ve ark 2022). Ciulli ve ark (2014), betanodavirus inokule ettikleri SSN-1 hücrelerini farklı sıcaklıklarda (10-15-20-25 ve 30°C) inkubasyona bırakmışlar ve CPE yönünden günlük mikroskopik olarak incelemişlerdir. Çalışma (2014)'da, 25°C'da inkube edilen hücrelerde 2 gün sonra, 20°C'da inkube edilen hücrelerde 3 gün sonra, 10°C'da inkube edilen hücrelerde ise 10 gün sonra CPE izlendiği bildirilmiştir. Kaplan ve Karaoğlu (2021), RT-qPCR ile genom varlığını tespit ettikleri örneklerden SSN-1 hücresine yaptıkları inokulasyonun ardından, 25°C'da inkubasyon sonucunda 4. günde vakuolizasyon ve lizisten oluşan CPE izlediklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan referans virusun üretilmesinde SSN-1 hücreleri kullanıldı. Çalışmada, referans betanodavirus (475/198) suşu SSN-1 hücresine inokule edilerek 24°C'da inkube edildi. Hücre kültürü tabletlerinde, inokulasyonu takip eden 5. günde vakuolizasyon ve lizis ile seyreden CPE oluşumu belirlendi. Yedinci günde ise hücrelerde % 80 oranında CPE belirlendi. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan referans betanodavirusun SSN-1 hücresinde üretilmesi, literatür (Iwamoto ve ark 2000, Ciulli ve ark 2014, Kaplan ve Karaoğlu 2021) ile de uyumlu bulundu.

Betanodavirusların, RT-qPCR ile teşhis edildiği birçok çalışma (Dalla Valle ve ark 2005, Grove ve ark 2006, Hick ve Whittington 2010, Panzarin ve ark 2010) yapılmıştır. Virusun genomik segmentlerini (RNA1 ve RNA2) hedefleyen, PCR temelli çok sayıda metot (Nishizawa ve ark 1994, Dalla Valle ve ark 2005, Grove ve ark 2006, Hick ve Whittington 2010, Panzarin ve ark 2010) geliştirilmiştir. Ancak WOA, yayınladığı raporda (Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals - 2019), ulusal referans kuruluşlarca yürütülen rutin VNN teşhis çalışmalarında, virusun RNA2 geninin hedeflendiği RT-qPCR'in daha uygun bir metot olduğunu bildirmiştir (Yang ve ark 2022). Ayrıca WOA (2019), Panzarin ve ark (2010)'nın geliştirdiği RT-qPCR metodunun, uluslararası VNN referans laboratuvarı standartlarına göre valide edildiği ve bilinen dört betanodavirus genotipi (RGNNV, SJNNV, BFNNV, TPNNV)'nin de tespiti için uygun olduğu bildirilmiştir. Türkiye'de Panzarin ve ark (2010)'nın geliştirdiği RT-qPCR ile betanodavirusların genom varlığının araştırıldığı birçok çalışma (Kaplan ve Karaoğlu 2021, Kaplan ve ark 2021, Kaplan ve ark 2022a, Kaplan ve ark 2022b, Oğuz ve ark 2023, Kaplan ve ark 2023) yapılmıştır. Bu tez

çalışmasında da lagünlerden örneklenen tüm balıklarda betanodavirus genom varlığının araştırılması, Panzarin ve ark (2010)'nın geliştirdiği, Kaplan ve Karaoğlu (2021) tarafından validasyonu gerçekleştirilen RT-qPCR ile yapılmıştır. Bu metot (2021), betanodavirusların teşhisi için viral balık hastalıkları konusunda ulusal referans kuruluş olan İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından da halen geçerli bir yöntem olarak uygulanmaktadır. Bu çalışmada örneklerde VNNV'nin genom varlığının RT-qPCR ile tespit edilebilmesinde pozitif kontrol olarak kullanılması için, SSN-1 hücresinde üretilen referans betanodavirusun titresi DKID<sub>50</sub> 10<sup>-6</sup> olarak bulundu. Her bir PCR çalışmasında titresi belirlenen pozitif kontrol virusların Real Time PCR cihazındaki ct değerlerinin 23.85-30.65 arasında olduğu belirlendi. Böylece hem ekstraksiyon pleytine hem de Real Time PCR cihazına konulan titresi belirlenen pozitif kontrol virusların ve buna bağlı olarak Real Time PCR cihazından alınan ct değerleri ile virusun titresi, Kaplan (2019)'ın yaptığı çalışma ile uyumlu bulunmuştur.

Türkiye'de kültür balıkçılığı gelişmekte ve ülkemiz bu konuda dünyada güçlü bir konumda bulunmaktadır. Bu sebeple kültür şartlarında yetiştiricilik yapılan tesislerde hastalıklar ile mücadele daha da önem kazanmaktadır. Sektörü ciddi anlamda tehdit eden betanodavirus enfeksiyonlarına karşı önlemlerin alınması gerekmektedir. Tesislerde alınacak en önemli önlem ise sağlıklı bireylerden oluşan damızlık anaçların devamlılığının sağlanmasıdır. Türkiye'de bulunan kuluçkahane ve yetiştiricilik tesislerinde betanodavirus salgınlarının ortaya çıkması durumunda tesiste itlaf, salgın durumunda alınacak aksiyonlardan bir tanesidir. Pek tabii ki düşünüldüğünde böyle bir senaryonun olması zor gibi görünmektedir. Ancak unutulmamalıdır ki salgınlar her an için en hazırlıksız olduğumuz zamanlarda ortaya çıkabilmektedir. Böyle bir senaryonun olması durumunda, sürdürülebilir yetiştiricilik için tesislerimize sağlıklı anaçların tedariki gerekmektedir. Bu sebepten dolayı doğal stoklarımız olan lagünlerin öneminin ne kadar büyük olduğu ortadadır. Dünya'da son yıllarda sağlıklı çevre, sağlıklı insan ve sağlıklı hayvan sloganı ile tek sağlık (One Health) konsepti benimsenir hale gelmiştir. Bu sebeple doğal yaşam alanlarında bulunan hayvanlar üzerinde yapılacak araştırmalar önemli hale gelmektedir. Bunun için de betanodavirus enfeksiyonlarının epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılması için tüm lagünler ve denizlerimizde daha fazla türde araştırma çalışmaları yapılmasının ülkemiz balıkçılığına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ülkemiz Akdeniz kıyısında

yer alan bu lagünlerde yaşıyan farklı türlerde, etkene yönelik düzenli tarama çalışmaları ile kontrollerin yapılması sürdürülebilir bir balıkçılık yönetimi açısından önem arz etmektedir.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akdeniz'e kıyısı olan ülkeler içinde Fransa, Portekiz, İspanya, İtalya, Yunanistan, Fas, Tunus, Lübnan ve İsrail gibi birçok ülkede hem kuluçkahane ve deniz kafes yetiştiriciliği yapılan tesislerde levrek ve çipuralarda betanodavirus varlığı açısından pek çok araştırma yürütülmüştür. Ayrıca ülkemizde levrek ve çipura kuluçkahaneleri ile denizde kafes yetiştiriciliği yapılan tesislerde betanodavirusların varlığına yönelik çalışmalar da yapılmıştır. Ancak lagünlerde doğal şartlarda yetişen levrek, çipura ve kefal balıklarında herhangi bir betanodavirus araştırması yapılmamıştır. Türkiye'de Akdeniz bölgesinde bulunan lagünlerde doğal olarak bulunan levrek, çipura ve kefal balıklarında betanodavirus varlığının araştırıldığı bir çalışma bulunmaması bu çalışmayı özgün kılmaktadır.

Bu çalışma ile Akdeniz bölgesi lagünleri (Akyatan, Akgöl-Paradeniz ve Beymelek)'nde bulunan Levrek, Çipura ve Kefal türlerinde betanodavirus varlığı ilk kez araştırıldı. Sonuç olarak RT-qPCR ile incelemesi yapılan 1080 adet balık örneklerinde VNNV genomu tespit edilmedi. Bu çalışma ile Akdeniz lagünlerinde Levrek, Çipura ve Kefal balıklarında betanodavirus tespit edilmemiş olması, doğal damızlık anaç stoklarımızın şu an için virus taşımadığını ortaya koymaktadır. Fakat ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz havzası ülkelerinde virusun hem kültürü yapılan balıklarda hem de doğada bulunan balıklarda tespit edildiği unutulmamalıdır. Epidemiyolojik araştırmalara katkı bakımından, duyarlı ve duyarsız balık türlerini de içinde bulunduran daha fazla örnek ile betanodavirusların araştırılması sürdürülebilir sağlıklı bir yetiştiricilik açısından önerilmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abram QH, Dixon B, Katzenback BA, 2017. Impacts of low temperature on the teleost immune system. *Biology*, 6, 4, 39.
- Ahmad AK, Amal MNA, Saad MZ, Murni M, Abdullah A, Mustafa S, Yusof NHN, 2019. Prevalence, Risk Factors and Transmission of Nervous Necrosis Virus in A Hatchery Producing Hybrid Grouper (*Epinephelus lanceolatus*-*Epinephelus fuscoguttatus*) Fry. *Pertanika J Trop Agric Sci*, 42. 1.
- Aranguren R, Tafalla C, Novoa B, Figueras A, 2002. Experimental transmission of encephalopathy and retinopathy induced by nodavirus to sea bream, *Sparus aurata* L, using different infection models. *J Fish Dis*, 25,6, 317-24.
- Arimoto M, Mushiake K, Mizuta Y, Nakai T, Muroge K, Furusawa I, 1992. Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fish Pathol*, 27, 191-95.
- Arimoto M, Sato J, Maruyama K, Mimura G, Furusawa I, 1996. Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture* 143, 15-22.
- Ashfaq H, Soliman H, Saleh M, El-Matbouli M, 2019. CD4: a vital player in the teleost fish immune system. *Vet Res*, 50, 1-11.
- Athanassopoulou F, Billinis C, Psychas V, Karipoglou K, 2003. Viral encephalopathy and retinopathy of *Dicentrarchus labrax* (L.) farmed in fresh water in Greece. *J Fish Dis*, 26, 6, 361-65.
- Athanassopoulou F, Billinis C, Prapas T, 2004. Important disease conditions of newly cultured species in intensive freshwater farms in Greece: first incidence of nodavirus infection in *Acipenser* sp. *Dis Aquat Organ*, 60, 3, 247-52.
- Bandín I and Souto S, 2020. Betanodavirus and VER disease: a 30-year research review. *Pathogens*, 9, 2, 106.
- Barsøe S, Skovgaard K, Sepúlveda D, Stratmann A, Vendramin N, Lorenzen N, 2021a. Nervous Necrosis Virus-like Particle (VLP) Vaccine Stimulates European Sea Bass Innate and Adaptive Immune Responses and Induces Long-Term Protection against Disease. *Pathogens*, 10,11, 1477.
- Barsøe S, Toffan A, Pascoli F, Stratmann A, Pretto T, Marsella A, Lorenzen N, 2021b. Long-term protection and serologic response of European sea bass vaccinated with a betanodavirus Virus-like Particle produced in *Pichia pastoris*. *Vaccines*, 9, 5, 447.
- Berzak R, Scheinin A, Davidovich N, Regev Y, Diga R, Tchernov D, Morick D, 2019. Prevalence of nervous necrosis virus (NNV) and *Streptococcus* species in wild marine fish and crustaceans from the Levantine Basin, Mediterranean Sea. *Dis Aquat Organ*, 133, 1, 7-17.
- Biasini L, Berto P, Abbadi M, Buratin A, Toson M, Marsella A, Pascoli F, 2022. Pathogenicity of different betanodavirus RGNNV/SJNNV reassortant strains in European Sea bass. *Pathogens*, 11, 4, 458.
- Bitchava K, Chassalevris T, Lampou E, Athanassopoulou F, Economou V, Dovas CI, 2019. Occurrence and molecular characterization of betanodaviruses in fish and invertebrates of the Greek territorial waters. *J Fish Dis*, 42, 12, 1773-83.
- Bovo G, Gustinelli A, Quaglio F, Gobbo F, Panzarin V, Fusaro A, Mutinelli F, Caffara M ve Fioravanti ML, 2011. Viral encephalopathy and retinopathy outbreak in freshwater fish farmed in Italy. *Dis Aquat Organ*, 96, 45-54.
- Breuil G, Bonami JR, Pepin JF, Pichot Y, 1991. Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 97, 2, 109-16.
- Breuil G, Pepin J, Boscher S, Thiery R, 2002. Experimental vertical transmission of nodavirus from broodfish to eggs and larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J Fish Dis*, 25, 697-702.
- Buonocore F, Nuñez-Ortiz N, Picchiatti S, Randelli E, Stocchi V, Guerra L, Scapigliati G, 2019.

- Vaccination and immune responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) against betanodavirus. *Fish Shellfish Immun*, 85, 78-84.
- Cabillon NAR and Lazado CC, 2019. Mucosal barrier functions of fish under changing environmental conditions. *Fishes*, 4, 1, 2.
- Chabrigillón M, Arijó S, Díaz-Rosales P, Balebona MC, Morinigo MA, 2006. Interference of *Listonella anguillarum* with potential probiotic microorganisms isolated from farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.). *Aquac Res*, 37, 1, 78-86.
- Castric J, Thiery R, Jeffroy J, De Kinkelin P, Raymond J, 2001. Sea bream *Sparus aurata*, an asymptomatic contagious fish host for nodavirus. *Dis Aquat Org*, 47, 33-38.
- Chaves Pozo E, Guardiola FA, Meseguer J, Esteban MA, Cuesta A, 2012. Nodavirus infection induces a great innate cell-mediated cytotoxic activity in resistant, gilthead seabream, and susceptible, European sea bass, teleost fish. *Fish Shellfish Immun*, 33,5, 1159-66.
- Chaves Pozo E, Arizcun M, Cuesta A, 2021. Betanodavirus genotypes produce clinical signs and mortality in the shi drum (*Umbrina cirrosa*), and infective particles are isolated from the damaged brain. *Aquaculture*, 541, 736777.
- Chen LJ, Su YC, Hong JR, 2009. Betanodavirus non-structural protein B1: A novel anti-necrotic death factor that modulates cell death in early replication cycle in fish cells. *Virology*, 385, 2, 444-54.
- Chen X, Qi J, He L, Luo H, Lin J, Qiu F, Zheng L, 2022. Isolation and identification of a new strain of nervous necrosis virus from the big-belly seahorse *Hippocampus abdominalis*. *Virol J*, 19, 1, 1-9.
- Chen Y, Shih C, Liu H, Wu C, Lin C, Wang H, 2011. An oral nervous necrosis virus vaccine using *Vibrio anguillarum* as an expression host provides early protection. *Aquaculture* 321, 26-33.
- Chen YM, Kuo CE, Wang TY, Shie PS, Wang WC, Huang SL, Chen TY, 2010. Cloning of an orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* heat shock protein 90AB (HSP90AB) and characterization of its expression in response to nodavirus. *Fish Shellfish Immun*, 28, 5, 895-904.
- Chen YM, Wang TY, Chen TY, 2014. Immunity to betanodavirus infections of marine fish. *Dev Comp Immunol*, 43, 2, 174-83.
- Cherif N, El Jeni R, Amdouni F, Zreilli S, Djabou H, Khemiri S, Groman D, 2021. Phylogeography of betanodavirus genotypes circulating in Tunisian aquaculture sites, 2012-2019. *Dis Aquat Organ*, 146, 53-63.
- Chi SC, Hu WW, Lo BJ, 1999. Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV). *J Fish Dis*, 22, 3, 173-82.
- Chi SC, Shieh JR, Lin SJ, 2003. Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Dis Aquat Organ*, 55, 221-28.
- Chi SC, Wu YC, Cheng TM, 2005. Persistent infection of betanodavirus in a novel cell line derived from the brain tissue of barramundi *Lates calcarifer*. *Dis Aquat Org*, 65, 2, 91-98.
- Ciulli S, Ostanello F, Battilani M, Prosperi S, Hedrick RP, 2004. Effect of temperature on Betanodavirus infection in SSN-1 cell line. *Vet Res Commun*, 28, 283-86.
- Ciulli S, Galletti E, Grodzki M, Alessi A, Battilani M, Prosperi S, 2007. Isolation and genetic characterization of Betanodavirus from wild marine fish from the Adriatic Sea. *Vet Res Commun*, 31, 1, 221-24.
- Costa JZ and Thompson KD, 2016. Understanding the interaction between Betanodavirus and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy. *Fish Shellfish Immun*, 53, 35-49.
- Combe M, Reverter M, Caruso D, Pepey E, Gozlan RE, 2023. Impact of Global Warming on the Severity of Viral Diseases: A Potentially Alarming Threat to Sustainable Aquaculture Worldwide. *Microorganisms*, 11, 4, 1049.

- Cutrín JM, Dopazo CP, Thiéry R, Leao P, Oliveira JG, Barja JL, Bandín I, 2007. Emergence of pathogenic betanodaviruses belonging to the SJNNV genogroup in farmed fish species from the Iberian Peninsula. *J Fish Dis*, 30, 4, 225-32.
- Dalla Valle L, Zanella L, Patarnello P, Paolucci L, Belvedere P, Colombo L, 2000. Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *J Fish Dis*, 23, 5, 321-27.
- Dalla Valle L, Negrisol E, Patarnello P, Zanella L, Maltese C, Bovo G, Colombo L, 2001. Sequence comparison and phylogenetic analysis of fish nodaviruses based on the coat protein gene. *Arch Virol*, 146, 1125-37.
- Dalla Valle L, Toffolo V, Lamprecht M, Maltese C, Bovo G, Belvedere P, Colombo L, 2005. Development of a sensitive and quantitative diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on two-target real-time PCR. *Vet Microbiol*, 110, 167-79.
- Den Boon JA, Zhan H, Unchwaniwala N, Horwill M, Slavik K, Pennington J, Ahlquist P, 2022. Multifunctional protein A is the only viral protein required for nodavirus RNA replication crown formation. *Viruses*, 14, 12, 2711.
- Diker KS, 2005. İmmunoloji, İkinci baskı, Ankara, Medisan, S. 85-93.
- Doan QK, Vandeputte M, Chatain B, Morin T, Allal F, 2017. Viral encephalopathy and retinopathy in aquaculture: a review. *J Fish Dis*, 40, 5, 717-42.
- Ergene S, 2000. Reproduction characteristics of thinlip grey mullet *Liza ramada* (Risso, 1826) inhabiting Akgöl-Paradeniz Lagoons (Göksü Delta). *Turk J Zool*, 24, 2, 159-64.
- Falco A, Bello-Perez M, Díaz-Puertas R, Mold M, Adamek M, 2021. Update on the inactivation procedures for the vaccine development prospects of a new highly virulent RGNNV isolate. *Vaccines*, 9, 12, 1441.
- FAO, 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, Italy.
- Fouzi MNM and Sakajamary N, 2023. First Report of Viral Nervous Necrosis in Asian Sea Bass, *Lates calcarifer* Cultured in Sri Lanka.
- Frerichs GN, Rodger HD, Peric Z, 1996. Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J Gen Virol*, 77, 9, 2067-71.
- Frerichs GN, Tweedie A, Starkey WG, Richards RH, 2000. Temperature, pH and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. *Aquaculture*, 185,1-2, 13-24.
- Frey HR and Liess B, 1971. Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit eines stark zytopathogenen VD-MD-Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode. *Zentralbl Veterinarmed*, 18, 1, 61-71.
- Furusawa R, Okinaka Y, Uematsu K, Nakai T, 2007. Screening of freshwater fish species for their susceptibility to a betanodavirus. *Dis Aquat Org*, 77, 119-25.
- García-Álvarez MÁ, Arizcun M, Chaves Pozo E, Cuesta A, 2022. Profile of innate immunity in gilthead seabream larvae reflects mortality upon betanodavirus reassortant infection and replication. *Int J Mol Sci*, 23, 9, 5092.
- Ghasemi M, Zorriehzahra MJ, Sharifpour E, Haghikarsidani S, 2013. Detection of betanodavirus antigen associated with viral nervous necrosis (VNN) in tissue sections of apparently healthy golden grey mullets, *Liza auratus*, by histopathology examination and indirect fluorescent antibody test (IFAT). *J Aquat*, 53-61.
- Glazebrook JS and Campbell RSF, 1987. Diseases of barramundi (*Lates calcarifer*) in Australia: A review. In *Management of Wild and Cultured Sea Bass/Barramundi (Lates calcarifer)*. ACIAR, 204-06.
- Gomez DK, Sato J, Mushiake K, Isshiki T, Okinaka Y, Nakai T, 2004. PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *J Fish Dis*, 27, 10, 603-08.

- Gomez DK, Lim DJ, Baeck GW, Youn HJ, Shin NS, Youn HY, Park SC, 2006. Detection of betanodaviruses in apparently healthy aquarium fishes and invertebrates. *J Vet Sci*, 7, 4, 369-74.
- Gomez DK, Baeck GW, Kim JH, Choresca Jr CH, Park SC, 2008. Molecular detection of betanodaviruses from apparently healthy wild marine invertebrates. *J Invertebr Pathol*, 97, 3, 197-202.
- Gomez DK, Mori K, Okinaka Y, Nakai T, Park SC, 2010. Trash fish can be a source of betanodaviruses for cultured marine fish. *Aquaculture*, 302, 3-4, 158-63.
- Grotmol S, 1995. Mass mortality of larval and juvenile hatchery-reared halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) associated with the presence of virus-like particles in vacuolated lesions in the central nervous system and retina. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 15, 176-80.
- Grotmol S, Totland GK, Thorud K, Hjeltnes BK, 1997. Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: a probable cause of mass mortality of cultured larval and juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Dis Aquat Org*, 29, 2, 85-97.
- Grotmol S and Totland GK, 2000. Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Dis Aquat Org*, 39, 89-96.
- Grove S, Fallner R, Soleim KB, Dannevig BH. 2006. Absolute quantitation of RNA by a competitive real-time RT-PCR method using piscine nodavirus as a model. *J Virol Methods*, 132, 104-12.
- Gye HJ ve Nishizawa T, 2018. Reducing background optical density in enzyme-linked immunosorbent assay for detecting nervous necrosis virus (NNV)-specific IgM by immobilizing fish sera. *Aquaculture*, 485, 93-100.
- Harak C and Lohmann V, 2015. Ultrastructure of the replication sites of positive-strand RNA viruses. *Virology*, 479, 418-33.
- Hassantabar F, Zorriehzahra MJ, Firouzbakhsh F, Thompson KD, 2021. Detection of betanodavirus in wild golden grey mullet (*Chelon aurata*) in southern parts of the Caspian Sea using Real-time RT-PCR and immunohistochemistry. *Iran J Fish Sci*, 20, 5, 1317-35.
- Hata N, Okinaka Y, Iwamoto T, Kawato Y, Mori K, Nakai T, 2010. Identification of RNA regions that determine temperature sensitivities in betanodaviruses. *Arch Virol*, 155, 10, 1597-606.
- Hegde A, Teh HC, Lam TJ, Sin YM, 2003. Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poecilia reticulata*—comparative characterization and pathogenicity studies. *Arch Virol*, 148, 575-86.
- Hick P and Whittington RJ, 2010. Optimisation and validation of a real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for detection of betanodavirus. *J Virol Methods*, 163, 368-77.
- Hick P, Schipp G, Bosmans J, Humphrey J, Whittington R, 2011. Recurrent outbreaks of viral nervous necrosis in intensively cultured barramundi (*Lates calcarifer*) due to horizontal transmission of betanodavirus and recommendations for disease control. *Aquaculture*, 319, 1-2, 41-52.
- Hick P, Tweedie A, Whittington RJ, 2011a. Optimization of betanodavirus culture and enumeration in striped snakehead fish cells. *J Vet Diag Invest*, 23, 465-75.
- ICTV, 2022. International Committee on Taxonomy of Viruses. Erişim adresi: <https://ictv.global/taxonomy>. Erişim tarihi: 01.12.2023.
- Ikenaga T, Tatecho Y, Nakai T, Uematsu K, 2002. Betanodavirus as a novel transneuronal tracer for fish. *Neuroscience letters*, 331, 1, 55-59.
- Isla FI, 1995. Coastal lagoons. *Dev Sedimentol*, 53, 241-72.
- Iwamoto T, Nakai T, Mori K, Arimoto M, Furusawa I, 2000. Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis Aquat Organ*, 43, 81-89.
- Iwamoto T, Mise K, Takeda A, Okinaka Y, Mori K, Arimoto M, Nakai T, 2005. Characterization of Striped jack nervous necrosis virus subgenomic RNA3 and biological activities of its encoded protein B2. *J Gen Virol*, 86, 10, 2807-16.
- Jeong KH, Kim HJ, Kim HJ, 2020. Current status and future directions of fish vaccines employing

- virus-like particles. *Fish Shellfish Immun*, 100, 49-57.
- Jithendran KP, Shekhar MS, Kannappan S, Azad IS, 2011. Nodavirus infection in freshwater ornamental fishes in India: diagnostic histopathology and nested RT-PCR. *Asian Fish Sci*, 24, 12-19.
- Johansen R, Ranheim T, Hansen MK, Taksdal T, Totland GK, 2002. Pathological changes in juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* persistently infected with nodavirus. *Dis Aquat Organ*, 50, 3, 161-69.
- Johansen R, Amundsen M, Dannevig BH, Sommer AI, 2003. Acute and persistent experimental nodavirus infection in spotted wolffish *Anarhichas minor*. *Dis Aquat Organ*, 57, 1-2, 35-41.
- Johansen R, Grove S, Svendsen AK, Modahl I, Dannevig B, 2004. A sequential study of pathological findings in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), throughout one year after an acute outbreak of viral encephalopathy and retinopathy. *J Fish Dis*, 27, 6, 327-41.
- Johnson KL, Price BD, Ball LA, 2003. Recovery of infectivity from cDNA clones of nodamura virus and identification of small nonstructural proteins. *Virology*, 305, 2, 436-51.
- Johnstone C, Pérez M, Arizcun M, García-Ruiz C, Chaves Pozo E, 2022. Reservoirs of red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) in squid and shrimp species of Northern Alboran Sea. *Viruses*, 14, 2, 328.
- Jung JW, Lee JS, Kim J, Im SP, Kim SW, Lazarte JM S, Jung TS, 2020. Involvement of CD4-1 T cells in the cellular immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) and nervous necrosis virus (NNV) infection. *Dev Comp Immunol*, 103, 103518.
- Kai YH and Chi SC, 2008. Efficacies of inactivated vaccines against betanodavirus in grouper larvae (*Epinephelus coioides*) by bath immunization. *Vaccine* 26, 1450-57.
- Kai YH, Su HM, Tai KT, Chi SC, 2010. Vaccination of grouper broodfish (*Epinephelus tukula*) reduces the risk of vertical transmission by nervous necrosis virus. *Vaccine* 28, 996-1001.
- Karber G, 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch Pharmacol Exp Pathol*, 162, 480-83.
- Kalaycı G, Özkan B, Pekmez K, Kaplan M, 2016. Levrek ve Çipura kuluçkahanelerinde Viral Nervöz Nekrozis Hastalığının Durumu. XII. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi Poster Sunumu. Kapadokya/Neşehir, 30 Ağustos - 02 Eylül 2016.
- Kaplan M, 2019. Türkiye’de levrek kuluçkahaneleri ve işletmelerinde Viral Nervöz Nekrozis (VNN) virusunun araştırılması, epidemiyolojisi ve moleküler karakterizasyonu. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kaplan M and Karaoğlu MT, 2021. Prevalence of Betanodavirus in Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax*) for All Production Stages in Turkey. Erişim Tarihi: 13.11.2023, Erişim Adresi: <https://www.researchsquare.com/article/rs-198154/v1>.
- Kaplan M, Pekmez K, Özkan B, Çağırman AA, Kalaycı G, 2021. Detection of RGNNV genotype betanodavirus in the Black Sea and monitoring studies. *Dis Aquat Organ*, 144, 117-21.
- Kaplan M, Pekmez K, Çağırman AA, Arslan F, Özkan B, Kalaycı G, 2022a. The first detection of betanodavirus reassortant genotype (RGNNV/SJNNV) isolated from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in the Turkish coastlines: The importance of screening and monitoring studies for identifying the source of the infection. *J Fish Dis*, 45, 6.
- Kaplan M, Pekmez K, Çağırman AA, Özkan B, Arslan F, Kafa B, Kalaycı G, 2022b. Türkiye’de Çift Kabuklu Yumuşakçalarda Betanodavirus Varlığının Araştırılması. *Acta Aquat Turc*, 18, 3, 415-25.
- Kaplan M, Pekmez K, Çağırman AA, Tekelioğlu BK, Oğuz U, Kafa B, Arslan F, Kalaycı G, 2023. Survey on Betanodavirus in Wild Fish Species in the Turkish Coastlines of the Mediterranean Sea and Molecular Characterization: detecting different genotypes from different fish in different locations. *Bull Eur Assoc*, 43, 2.
- Kara HM, Chaoui L, Derbal F, Zaidi R, De Boissésou C, Baud M, Bigarré L, 2014. Betanodavirus-associated mortalities of adult wild groupers *Epinephelus marginatus* (Lowe) and *Epinephelus*

- costae (Steindachner) in Algeria. *J Fish Dis*, 37, 3, 273-78.
- Katselis G, Koukou K, Dimitriou E, Koutsikopoulos C, 2007. Short-term seaward fish migration in the Messolonghi–Etoliko lagoons (Western Greek coast) in relation to climatic variables and the lunar cycle. *Estuar Coast Shelf S*, 73, 3-4, 571-82.
- Keawcharoen J, Techangamsuwan S, Ponpornpisit A, Lombardini ED, Patchimasiri T, Pirarat N, 2015. Genetic characterization of a betanodavirus isolated from a clinical disease outbreak in farm-raised tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) in Thailand. *J Fish Dis*, 38, 1, 49-54.
- Kendall Jr AW, 1984. Early life history stage of fishes and their characters. *Ontogeny and systematics of fishes*, 11-22.
- Keser N, 2011. Beymelek lagününün limnolojik ve jeomorfolojik özellikleri. *Marmara Coğrafya Dergisi*, 24, 258-86.
- Kim YC, Kwon WJ, Kim MS, Kim KI, Min JG, Jeong HD, 2018. High prevalence of betanodavirus barfin flounder nervous necrosis virus as well as red-spotted grouper nervous necrosis virus genotype in shellfish. *J Fish Dis*, 41, 2, 233-46.
- Korsnes K, Devold M, Nerland AH, Nylund A, 2005. Viral encephalopathy and retinopathy (VER) in Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal challenge with a nodavirus from Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Dis Aquat Organ*, 68, 1, 7-16.
- Korsnes K, Karlsbakk E, Devold M, Nerland AH, Nylund A, 2009. Tissue tropism of nervous necrosis virus (NNV) in Atlantic cod, *Gadus morhua* L., after intraperitoneal challenge with a virus isolate from diseased Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *J Fish Dis*, 32(8), 655-665.
- Kunz-Ramsay Y, 2013. *Developmental biology of teleost fishes*. Springer Science and Business Media, Vol 28, 3-12.
- Liltved H, Vogelsang C, Modahl I, Dannevig BH, 2006. High resistance of fish pathogenic viruses to UV irradiation and ozonated seawater. *Aquacult Eng*, 34, 2, 72-82.
- Liu W, Hsu CH, Hong YR, Wu SC, Wang CH, Wu YM, Lin CS, 2005. Early endocytosis pathways in SSN-1 cells infected by dragon grouper nervous necrosis virus. *J Gen Virol*, 86, 9, 2553-61.
- Lopez-Jimena B, Cherif N, Garcia-Rosado E, Infante C, Cano I, Castro D, Alonso MDC, 2010. A combined RT-PCR and dot-blot hybridization method reveals the coexistence of SJNNV and RGNNV betanodavirus genotypes in wild meagre (*Argyrosomus regius*). *J Appl Microbiol*, 109, 4, 1361-69.
- Low CF, Syarul Nataqain B, Chee HY, Rozaini MZH, Najiah M, 2017. Betanodavirus: Dissection of the viral life cycle. *J Fish Dis*, 40, 11, 1489-96.
- Lu MW, Liu W, Lin CS, 2003. Infection competition against grouper nervous necrosis virus by virus-like particles produced in *Escherichia coli*. *J Gen Virol*, 84, 6, 1577-82.
- Majewska A, Lasek W, Janyst M, Młynarczyk G, 2015. Inhibition of adenovirus multiplication by inosine pranobex and interferon  $\alpha$  in vitro. *Cent Eur J Immunol*, 40, 4, 395-99.
- Maltese C and Bovo G, 2007. Monografie viral encephalopathy and retinopathy. *Ittiopatologia* 4, 93-146.
- Marsian J, Hurdiss DL, Ranson NA, Ritala A, Paley R, Cano I, Lomonossoff GP, 2019. Plant-made nervous necrosis virus-like particles protect fish against disease. *Front Plant Sci*, 880.
- Maurice S, Nussinovitch A, Jaffe N, Shoseyov O, Gertler A, 2004. Oral immunization of *Carassius auratus* with modified recombinant A-layer proteins entrapped in alginate beads. *Vaccine*, 23,4, 450-59.
- Mazelet L, Dietrich J, Rolland JL, 2011. New RT-qPCR assay for viral nervous necrosis virus detection in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.): application and limits for hatcheries sanitary control. *Fish shellfish immun*, 30, 1, 27-32.
- Milano S, Dieli M, Millott S, Miceli MD, Maltese E, Cillari E, 1991. Effect of isoprinosine on IL-2, IFN- $\gamma$  and IL-4 production in vivo and in vitro. *Int Immunopharmacol*, 13, 7, 1013-18.
- Mladineo I, 2003. The immunohistochemical study of nodavirus changes in larval, juvenile and adult

- sea bass tissue. *J Appl Ichthyol*, 19, 6, 366-70.
- Moreno P, Oliveira JG, Labella A, Cutrín JM, Baro JC, Borrego JJ, Dopazo CP, 2014. Surveillance of viruses in wild fish populations in areas around the Gulf of Cadiz (South Atlantic Iberian Peninsula). *Appl Environ Microbiol*, 80, 20, 6560-71.
- Moreno P, Álvarez-Torres D, Balebona MC, Domínguez-Maqueda M, Moriñigo MÁ, Béjar J, García-Rosado E, 2023. Inhibition of nervous necrosis virus replication by *Shewanella putrefaciens* Pdp11 extract. *Aquaculture*, 739812.
- Mori K, Nakai T, Muroga K, Arimoto M, Mushiake K, Furusawa I, 1992. Properties of a new virus belonging to nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, 187, 1, 368-71.
- Mori K, Mangyoku T, Iwamoto T, Arimoto M, Tanaka S, Nakai T, 2003. Serological relationships among genotypic variants of betanodavirus. *Dis Aquat Organ*, 57, 1-2, 19-26.
- Mori K, Sugaya T, Nishioka T, Gomez DK, Fujinamy Y, Oka M, Arimoto M, Okinaka Y, Nakai T, 2005. Detection of betanodavirus from feed fish used in aquaculture. 12<sup>th</sup> International Conference Disease of Fish and Shellfish, Bull. Eur. Assoc. Copenhagen, 11-16 September 2005.
- Munday BL, Langdon JS, Hyatt A, Humphrey JD, 1992. Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Aquaculture*, 103, 3-4, 197-211.
- Munday BL and Nakai T, 1997. Nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 13, 4, 375-81.
- Munday BL, Kwang J, Moody N, 2002. Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis*, 25, 127-42.
- Mushiake K, Nishizawa T, Nakai T, Furusawa I, Muroga K, 1994. Control of VNN in striped jack: Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol*, 29, 177-82.
- Nakai T, Mori K, Sugaya T, Nishioka T, Mushiake K, Yamashita H, 2009. Current Knowledge on Viral Nervous Necrosis (VNN) and its Causative Betanodaviruses. *Isr J Aquacult-Bamid*, 61, 3, 198-207.
- Natnan ME, Low CF, Chong CM, Bunawan H, Baharum SN, 2021. Integration of omics tools for understanding the fish immune response due to microbial challenge. *Front Mar Sci*, 8, 668771.
- Naveen Kumar S, Hassan MA, Mahmoud MA, Al-Ansari A, Al-Shwared WK 2017. Betanodavirus infection in reared marine fishes along the Arabian Gulf. *Aquac Int*, 25, 1543-54.
- Nishizawa T, Mori K, Nakai T, Furusawa I, Muroga K, 1994. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis Aquat Organ*, 18, 103-07.
- Nishizawa T, Mori K, Furuhashi M, Nakai T, Furusawa I, Muroga K, 1995. Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *J Gen Virol*, 76, 7, 1563-69.
- Nishizawa T, Muroga K, Arimoto M, 1996. Failure of the polymerase chain reaction (PCR) method to detect striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in striped jack *Pseudocaranx dentex* selected as spawners. *J Aquat Anim Health*, 8, 4, 332-34.
- Nishizawa T, Furuhashi M, Nagai T, Nakai T, Muroga K, 1997. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl Environ Microbiol*, 63, 1633-36.
- Nguyen HD, Mushiake K, Nakai T, Muroga K, 1997. Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack. *Dis Aquat Organ*, 28, 2, 87-91.
- Nylund A, Karlsbakk E, Nylund S, Isaksen T. E, Karlsen M, Korsnes K, Ottem KF, 2008. New clade of betanodaviruses detected in wild and farmed cod (*Gadus morhua*) in Norway. *Arch Virol*, 153, 3, 541-47.

- Oğuz U, Kaplan M, Kalaycı G, 2023. Koi (*Cyprinus carpio*) ve Japon Balıklarında (*Carassius auratus*) Betanodavirus varlığının araştırılması. *Limnofish*, 9, 1, 37-42.
- Okinaka Y and Nakai T, 2008. Comparisons among the complete genomes of four betanodavirus genotypes. *Dis Aquat Organ*, 80, 2, 113-21.
- Olveira JG, Soares F, Engrola S, Dopazo CP, Bandín I, 2008. Antemortem versus postmortem methods for detection of betanodavirus in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *J Vet Diagn Invest*, 20, 2, 215-19.
- Olveira JG, Souto S, Dopazo CP, Thiéry R, Barja JL, Bandín I, 2009. Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. *J Gen Virol*, 90, 12, 2940-51.
- Olveira JG, Souto S, Dopazo CP, Bandín I, 2013. Isolation of betanodavirus from farmed turbot *Psetta maxima* showing no signs of viral encephalopathy and retinopathy. *Aquaculture*, 406, 125-30.
- Özkan Özyer B, Kalaycı G, İnçoğlu Ş, 2012. Ege bölgesindeki Levrek (*Dicentrarchus labrax* L.) ve Çipura (*Sparus aurata*) İşletmelerinde Viral Nervöz Nekrozis Hastalığının Varlığının Araştırılması. *Bornova Vet Bil Derg*, 34, 48, 1-8.
- Özkan Özyer B, Kalaycı G, İnçoğlu Ş, Pekmez K, Küçükali Y, 2014. The first isolation of betanodavirus from cultured seabass in Turkey. *Bornova Vet Bil Derg*, 36, 50, 13-17.
- Padrós F, Caggiano M, Toffan A, Constenla M, Zarza C, Ciulli S, 2022. Integrated Management Strategies for Viral Nervous Necrosis (VNN) Disease Control in Marine Fish Farming in the Mediterranean. *Pathogens*, 11, 3, 330.
- Pakingking JR, Bautista NB, Evlyn Grace de Jesus-Ayson, Reyes O, 2010. Protective immunity against viral nervous necrosis (VNN) in brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) following vaccination with inactivated betanodavirus. *Fish Shellfish Immun*, 28, 525-33.
- Panzarin V, Patarnello P, Mori A, Rampazzo E, Cappellozza E, Bovo G, Cattoli G, 2010. Development and validation of a real-time Taqman PCR assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens. *Arch Virol*, 155, 1197-203.
- Panzarin V, Fusaro A, Monne I, Cappellozza E, Patarnello P, Bovo G, Cattoli G, 2012. Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. *Infect Genet Evol*, 12, 1, 63-70.
- Panzarin V, Cappellozza E, Mancin M, Milani A, Toffan A, Terregino C, Cattoli G, 2014. In vitro study of the replication capacity of the RGNNV and the SJNNV betanodavirus genotypes and their natural reassortants in response to temperature. *Vet Res*, 45, 1, 1-11.
- Panzarin V, Toffan A, Abbadi M, Buratin A, Mancin M, Braaen S, Cattoli G, 2016. Molecular basis for antigenic diversity of genus Betanodavirus. *PloS one*, 11, 7.
- Peruzza L, Pascoli F, Dalla Rovere G, Franch R, Ferraresso S, Babbucci M, Bargelloni L, 2021. Transcriptome analysis reveals a complex response to the RGNNV/SJNNV reassortant Nervous Necrosis Virus strain in sea bream larvae. *Fish Shellfish Immun*, 114, 282-92.
- Petrova M, Jelev D, Ivanova A, Krastev Z, 2010. Isoprinosine affects serum cytokine levels in healthy adults. *J Interferon Cytokine Res*, 30, 4, 223-28.
- Poisa-Beiro L, Dios S, Montes A, Aranguren R, Figueras A, Novoa B, 2008. Nodavirus increases the expression of Mx and inflammatory cytokines in fish brain. *Mol Immunol*, 45, 1, 218-25.
- Plant KP and LaPatra SE, 2011. Advances in fish vaccine delivery. *Dev Comp Immunol*, 35, 12, 1256-62.
- Pringle CR, 1997. Proceedings of the 26<sup>th</sup> Meeting of the Executive Committee of the ICTV, Strasbourg, France, May10-11, 1997. *Arch Virol* 142, 1727-33.
- Ransangan J and Manin BO, 2010. Mass mortality of hatchery-produced larvae of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch), associated with viral nervous necrosis in Sabah, Malaysia *Vet Microbiol*, 145, 1-2, 153-57.
- Rojó I, Ilárduya ÓM, Estonba A, Pardo MÁ, 2007. Innate immune gene expression in individual zebrafish after *Listonella anguillarum* inoculation. *Fish Shellfish Immun*, 23, 6, 1285-93.

- Sahul Hameed AS, Ninawe AS, Nakai T, Chi SC, Johnson KL, ICTV Report Consortium, 2019. ICTV virus taxonomy profile: Nodaviridae. *J Gen Virol*, 100, 1, 3-4.
- Sánchez JLF, Le Breton A, Brun E, Vendramin N, Spiliopoulos G, Furones D, Basurco B, 2022. Assessing the economic impact of diseases in Mediterranean grow-out farms culturing European sea bass. *Aquaculture*, 547, 737530.
- Savoca S, Abbadi M, Toffan A, Salogni C, Iaria C, Capparucci F, Marino F, 2021. Betanodavirus infection associated with larval enteropathy as a cause of mortality in cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 541, 736844.
- Scapigliati G, Buonocore F, Randelli E, Casani D, Meloni S, Zarletti G, Alvarez MC, 2010. Cellular and molecular immune responses of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) experimentally infected with betanodavirus. *Fish Shellfish Immun*, 28,2, 303-11.
- Sharma SK, Pradeep MA, Dube PN, Kumar TA, Kumar R, Swaminathan TR, 2019. Betanodavirus-associated mortality in Asian seabass (*Lates calcarifer*, Bloch) cultured in indoor tanks and sea cages. *Aquac Int*, 27, 279-86.
- Sharpe CS, 2007. Physiological stress responses to automated and hand vaccine injection procedures in yearling coho salmon. *N Am J Aquac*, 69, 2, 180-84.
- Shetty M, Maiti B, Shivakumar Santhosh K, Venugopal MN, Karunasagar I, 2012. Betanodavirus of marine and freshwater fish: distribution, genomic organization, diagnosis and control measures. *Indian J Virol*, 23, 114-23.
- Simón R, Docando F, Nuñez-Ortiz N, Tafalla C, Díaz-Rosales P, 2021. Mechanisms used by probiotics to confer pathogen resistance to teleost fish. *Front Immunol*, 12, 653025.
- Sitar R, Švara T, Fajfar AG, Šturm S, Cvetko M, Fonda I, Gombač M, 2021. The first outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Slovenia. *Slov Vet Res*, 58, 4, 137-45.
- Skliris GP, Krondiris JV, Sideris DC, Shinn AP, Starkey WG, Richards RH, 2001. Phylogenetic and antigenic characterization of new fish nodavirus isolates from Europe and Asia. *Virus Res*, 75, 1, 59-67.
- Sommerset I, Krossøy B, Biering E, Frost P, 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Rev Vaccines*, 4, 1, 89-101.
- Souto S, Merour E, Biacchesi S, Bremont M, Olveira JG, Bandín I, 2015. In vitro and in vivo characterization of molecular determinants of virulence in reassortant betanodavirus. *J Gen Virol*, 96, 6, 1287-96.
- Souto S, Lopez Jimena B, Alonso MDC, Garcia Rosado E, Bandin I, 2015a. Experimental susceptibility of European sea bass and Senegalese sole to different betanodavirus isolates. *Vet Microbiol*, 177, 1-2, 53-61.
- Souto S, Olveira JG, Alonso MC, Dopazo CP, Bandín I, 2018. Betanodavirus infection in bath-challenged *Solea senegalensis* juveniles: A comparative analysis of RGNNV, SJNNV and reassortant strains. *J Fish Dis*, 41, 10, 1571-78.
- Souto S, Vázquez-Salgado L, Olveira JG, Bandín I, 2019. Amino acidic substitutions in the polymerase N-terminal region of a reassortant betanodavirus strain causing poor adaptation to temperature increase. *Vet Res*, 50, 1-11.
- Spearman C, 1908. The method of right and wrong cases (constant stimuli) without Gauss's formulae. *Br J Psychol*, 2, 3, 227.
- Starkey W, Ireland J, Muir K, Shinn A, Richards R, Ferguson H, 2000. Isolation of nodavirus from Scottish farmed halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L). *J Fish Dis*, 23, 6, 419-22
- TAGEM 2021. Levrek yetiştiriciliğinde yerli ıslah hatlarının oluşturulması. Proje No: TAGEM/HAYSÜD/G/21/AG/P2/2732, Ankara.
- Taha E, Shawky M, Ahmed B, Moustafa M, Yousif A, Abdelaziz M, 2020. Emergence of viral nervous necrosis is associated with mass mortality in hatchery-reared tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Egypt. *Aquac Int*, 28, 1811-23.

- Tan C, Huang B, Chang SF, Ngho GH, Munday B, Chen SC, Kwang J, 2001. Determination of the complete nucleotide sequences of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) nervous necrosis virus, Singapore strain. *J Gen Virol*, 82, 3, 647-53.
- Tanaka S, Kuriyama I, Nakai T, Miyazaki T, 2003. Susceptibility of cultured juveniles of several marine fish to the sevenband grouper nervous necrosis virus. *J Fish Dis*, 26, 2, 109-15.
- Tang G and Suter PM, 2011. Vitamin A, nutrition, and health values of algae: *Spirulina*, *Chlorella*, and *Dunaliella*. *JPANS*, 1, 2, 111-18.
- Tang L, Lin CS, Krishna NK, Yeager M, Schneemann A, Johnson JE, 2002. Virus-Like Particles of a Fish Nodavirus Display a Capsid Subunit Domain Organization Different from That of Insect Nodaviruses. *J Virol*, 76, 12, 6370–75.
- Tarrab K, Ravid-Peretz S, Ucko M. 2019. Immunoserology of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and white grouper (*Epinephelus aeneus*) as a non-lethal diagnostic tool for viral nervous necrosis. *Aquac Int*, 27, 1, 63-77.
- Toffan A, Panzarin V, Toson M, Cecchetti K, Pascoli F, 2016. Water temperature affects pathogenicity of different betanodavirus genotypes in experimentally challenged *Dicentrarchus labrax*. *Dis Aquat Organ*, 119, 3, 231-38.
- Toffan A, Pascoli F, Prett T, Panzarin V, Abbadi M, Buratin A, Padrós F, 2017. Viral nervous necrosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) caused by reassortant betanodavirus RGNNV/SJNNV: An emerging threat for Mediterranean aquaculture. *Scientific Reports*, 7, 1, 1-12.
- Toffan A and Panzarin V, 2020. 6. Viral Encephalopathy and Retinopathy/Viral Nervous Necrosis (VER/VNN). *Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches*, 75, 45-60.
- Toffan A, Biasini L, Prett T, Abbadi M, Buratin A, Franch R, Pascoli F, 2021. Age dependency of RGNNV/SJNNV viral encephalo-retinopathy in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 539.
- Toubanaki DK, Margaroni M, Karagouni E, 2015. Development of a novel allele-specific PCR method for rapid assessment of nervous necrosis virus genotypes. *Curr Microbiol*, 71, 5, 529-39.
- Toubanaki DK, Efstathiou A, Karagouni E, 2022. Transcriptomic analysis of fish hosts responses to nervous necrosis virus. *Pathogens*, 11, 2, 201.
- Toubanaki DK, Efstathiou A, Tzortzatos OP, Valsamidis MA, Papaharisis L, Bakopoulos V, Karagouni E, 2023. Nervous Necrosis Virus Modulation of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) Immune Genes and Transcriptome towards Establishment of Virus Carrier State. *Int J Mol Sci*, 24, 23, 16613.
- TUİK, 2021. Su Ürünleri İstatistikleri. Erişim Tarihi: 26.02.2024. Erişim Adresi: <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Su-Urunleri-2021>
- Türkmen A, Tepe Y, Türkmen M, Ateş A, 2012. Investigation of metals in tissues of fish species from Akyatan Lagoon. *Fresenius Environ Bull*, 21, 11c, 3562-67.
- Ucko M, Colorni A, Diamant A, 2004. Nodavirus infections in Israeli mariculture. *J Fish Dis*, 27, 8, 459-69.
- Uysal K, Emre Y, Köse E, 2008. The determination of heavy metal accumulation ratios in muscle, skin and gills of some migratory fish species by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) in Beymelek Lagoon (Antalya/Turkey). *Microchem J*, 90,1, 67-70.
- Valencia JM, Grau A, Prett T, Pons J, Jurado-Rivera JA, Castro JA, Catanese G, 2019. Viral encephalopathy and retinopathy (VER) disease in *Epinephelus marginatus* from the Balearic Islands marine protected areas. *Dis Aquat Organ*, 135, 1, 49-58.
- Valero Y, Arizcun M, Esteban MA, Bandín I, Oliveira JG, Patel S, Chaves Pozo E, 2015. Nodavirus colonizes and replicates in the testis of gilthead seabream and European sea bass modulating its immune and reproductive functions. *PLoS One*, 10, 12.
- Valero Y, Cuesta A, Cammarata M, Esteban MA, Chaves Pozo E, 2018. Immune-endocrine interactions in the fish gonad during infection: an open door to vertical transmission. *Fishes*, 3, 2, 24.
- Valero Y, López-Vázquez C, Souto S, Oliveira JG, Cuesta A, Bandín I, 2021. Differential Nervous

- Necrosis Virus (NNV) Replication in Five Putative Susceptible Cell Lines. *Pathogens*, 10, 12, 1565.
- Valero Y, Cuesta A, 2023. Reassortant viruses threatening fish aquaculture. *Rev Aquacult*, 15 (4), 1720-31.
- Vaz M, Pires D, Pires P, Simões M, Pombo A, Santos P, Baptista T, 2022. Early Immune Modulation in European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) Juveniles in Response to Betanodavirus Infection. *Fishes*, 7,2, 63.
- Vázquez-Salgado L, Oliveira JG, Dopazo CP, Bandín I, 2020. Role of rotifer (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* (*Artemia salina*) nauplii in the horizontal transmission of a natural nervous necrosis virus (NNV) reassortant strain to Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Vet Q*, 40, 1, 205-14.
- Vázquez-Salgado L, Pascoli F, Marsella A, Biasini L, Buratin A, Pretto T, Toffan A, 2022. Role of rotifers in betanodavirus transmission to European sea bass larvae. *Front Vet Sci*, 9, 932327.
- Vázquez-Salgado L, Oliveira JG, Dopazo CP, Bandín I, 2023. Detection of different betanodavirus genotypes in wild fish from Spanish Atlantic coastal waters (Galicia, North-western Spain). *J Aquat Anim Health*, 35, 3.
- Vendramin N, Patarnello P, Toffan A, Panzarin V, Cappellozza E, Tedesco P, Terlizzi A, Terregino C, Cattoli G, 2013. Viral retinopathy in groupers (*Epinephelus* spp.) in southern Italy: a threat for wild endangered species? *BMC Vet Res*, 9, 20.
- Vimal S, Madan N, Farook MA, Nambi KSN, Majeed SA, Rajkumar T, Hameed AS, 2014. Production of recombinant vaccine using capsid gene of nodavirus to protect Asian sea bass, Lates calcarifer (Bloch, 1790). *Aquaculture*, 418, 148-54.
- Volpe E, Pagnini N, Serratore P, Ciulli S, 2017. Fate of redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) in experimentally challenged Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Dis Aquat Organ*, 125, 1, 53-61.
- Volpe E, Gustinelli A, Caffara M, Errani F, Quaglio F, Fioravanti ML, Ciulli S, 2020. Viral nervous necrosis outbreaks caused by the RGNNV/SJNNV reassortant betanodavirus in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 523, 735155.
- Wang Q, Ji W, Xu Z, 2020. Current use and development of fish vaccines in China. *Fish Shellfish Immun*, 96, 223-34.
- Watanabe KI, Nishizawa T, Yoshimizu M, 2000. Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis Aquat Organ*, 41, 3, 219-23.
- World Health Organization (WHO), 2017. Guidelines for Drinking-Water Quality, 4th ed.; Incorporating the 1st Addendum; WHO: Geneva, Switzerland.
- World Organization for Animal Health (WOAH), 2015. Aquatic animal health code. Section 1, Chapter 1.4 Aquatic animal health surveillance.
- World Organization for Animal Health (WOAH), 2019. Viral encephalopathy and retinopathy. In: *Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases*, Chapter 2.3.12.
- Yamashita H, Mori K, Nakai T, 2009. Protection conferred against viral nervous necrosis by simultaneous inoculation of aquabirnavirus and inactivated betanodavirus in the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg). *J Fish Dis*, 32, 2, 201-10.
- Yang Z, Yue GH, Wong SM, 2022. VNN disease and status of breeding for resistance to NNV in aquaculture. *Aquac Fish*, 7, 2, 147-57.
- Yanuhar U, Arfiati D, Musa M, Junirahma NS, Caesar NR, 2020. The Status of VNN (Viral Nervous Necrosis)-Infected Grouper Fish Tissue with *Chlorella vulgaris* Extract as Anti-Virus Candidate. In *Journal of Physics, Conference Series*, 1665, 1, 12036.
- Yoshikoshi K and Inoue K, 1990. Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *J Fish Dis*, 13, 1, 69-77.

- Yoshimizu M, 2009. Control strategy for viral diseases of salmonid fish, flounders and shrimp at hatchery and seed production facility in Japan. *Fish Pathol*, 44, 1, 9-13.
- Zenke K and Okinaka Y, 2022. Multiple isoforms of HSP70 and HSP90 required for betanodavirus multiplication in medaka cells. *Arch Virol*, 167,10, 1961-75.
- Zhang YA, Salinas I, Li J, Parra D, Bjork S, Xu Z, Sunyer JO, 2010. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat Immunol*, 11, 9, 827-35.
- Zhang Y, Dong F, Xing J, Tang X, Sheng X, Chi H, Zhan W, 2022. Characterization of Nervous Necrosis Virus (NNV) Nonstructural Protein B2 and Its Enhancement on Virus Proliferation. *Viruses*, 14, 12, 2818.
- Zhu S, Li J, Huang AG, Huang JQ, Huang YQ, Wang GX, 2019. Anti-betanodavirus activity of isoprinosine and improved efficacy using carbon nanotubes based drug delivery system. *Aquaculture*, 512, 734377.
- Zrnčić S, Brnić D, Panzarin V, Abadi M, Lojkić I, Zupčić IG, Oraić D, 2022. Transmission Pathways of the VNN Introduced in Croatian Marine Aquaculture. *Pathogens*, 11, 4, 418.
- Zorriehzahra MJ, Nazari A, Ghasemi M, Ghiasi M, Karsidani S. H, Bovo G, Daud HHM, 2014. Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: a probable cause of mass mortality of wild Golden grey mullet (*Liza aurata*) and Sharpnose grey mullet (*Liza saliens*) in Iranian waters of the Caspian Sea. *Virus Disease*, 25, 4, 430-36.
- Zorriehzahra MJ, 2020. Viral nervous necrosis disease, In: *Emerging and reemerging viral pathogens*, Ed. Ennaji MM, Elsevier, London/United Kingdom, 673-703.
- Zorriehzahra MJ, Ziarati M, Hassantabar F, 2022. Comparative Study of Different Methods for Viral Nervous Necrosis (VNN) Diagnosis in Fish. *JISSN*, 2766-7.

## 8. TURNİTİN RAPORU

Akdeniz Bölgesinde Bulunan Lagünlerdeki (Akyatan, Akgöl-Paradeniz ve Beymelek) Levrek (*Dicentrarchus labrax*), Çipura (*Sparus aurata*) ve Bazı Kefal Türlerinde (*Mugil spp.*) Viral Nervöz Nekrozis (VNN) V

### ORJİNALLİK RAPORU

% <b>10</b>	% <b>9</b>	% <b>4</b>	% <b>4</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	<a href="http://acikbilim.yok.gov.tr">acikbilim.yok.gov.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>3</b>
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% <b>2</b>
3	<a href="http://nursingedu8.com">nursingedu8.com</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
4	<a href="http://www.limnofish.org">www.limnofish.org</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
5	<a href="http://www.tarimorman.gov.tr">www.tarimorman.gov.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
6	<a href="http://www.woah.org">www.woah.org</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
7	Arslan, Erdem. "Plazmid aracılı kinolon direnci (Qnrs1 and Aac (6')-ib-cr) ve enrofloksasin ile eliminasyonu", Bursa Uludag University (Turkey), 2021	<% <b>1</b>