

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VİROLOJİ ANABİLİM DALI**

**KARADENİZ BÖLGESİNDEKİ BALIKLARDA VİRAL
HEMORAJİK SEPTİSEMİ VİRÜSÜNÜN İZOLASYONU
ve PATOJENİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Hakan İŞİDAN

ELAZIĞ – 2010

ONAY SAYFASI


Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Emine ÜNSALDI

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Veteriner Fakültesi Viroloji

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Yusuf BOLAT



Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yusuf BOLAT (Danışman)



Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Yusuf BOLAT



Prof. Dr. Hakan BULUT



Prof. Dr. Hasan Basri ERTAŞ



Doç. Dr. Orhan YAPICI



Doç. Dr. Hasan ÖNGÖR



Bu tezi Sedef'ime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Başta beni bu konuya yönlendiren kıymetli Hocam Prof. Dr. Yusuf BOLAT, Prof. Dr. Hakan BULUT ve Doç. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ'ye şükranlarımı sunarım. Ayrıca, laboratuvar çalışmalarında hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen Dr. Şükrü TONBAK ve Dr. İrem GÜLAÇTI'ya da teşekkür ederim. Doktora çalışmam boyunca her konuda ve her zaman yanımda olan kardeşim İbrahim SÖZDUTMAZ'a, tarama ve laboratuvar çalışmalarında gece gündüz demeden çalışan oda arkadaşım İlyas KUTLU'ya, hazırladığım projenin Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) proje değerlendirme grup toplantısında sunumunu benim yerime yapan değerli arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Harun ALBAYRAK'a, deneme enfeksiyonu çalışmalarında yardımını esirgemeyen değerli büyüğüm Eyüp ÇAKMAK'a, ev arkadaşım Murat DAĞTEKİN'e, proje çalışmalarında her türlü ihtiyacıma cevap veren Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürü Dr. Atilla ÖZDEMİR'e ve bu tezin gerçekleşebilmesi için gereken maddi desteği sağlayan TAGEM'e teşekkürü bir borç bilirim.

Sevgili anneme ve babama, bana bu güne kadar vermiş oldukları manevi ve maddi tüm desteklerden dolayı bütün kalbimle ve ellerini öperek teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI.....	i
ONAY SAYFASI.....	ii
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ.....	4
3.1. Etiyoloji.....	5
3.2. Epidemiyoloji.....	10
3.3. Klinik Belirtiler.....	12
3.4. Patogenez.....	13
3.5. Patoloji.....	16
3.6. Teşhis.....	17
3.7. Bağışıklık.....	18
3.8. Koruma ve Kontrol.....	21
4. GEREÇ ve YÖNTEM.....	24
4.1. Örnekler.....	24
4.2. Hücre Kültüründe Virüs İzolasyonu.....	28

4.2.1. Hücre Hatları ve Vasatları.....	28
4.2.2. Hücrelerin Ekim İçin Hazırlanması.....	28
4.2.3. Hücre Kültürüne İnokulasyon.....	29
4.3. Virüsler.....	30
4.4. Virüs Titrasyon Testi.....	30
4.5. Virüs Nötralizasyon Testi.....	31
4.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	31
4.6.1. Viral RNA Ekstraksiyonu.....	31
4.6.2. Tersine Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)	32
4.6.3. RT-PZR Ürünlerinin Jel Elektroferezinde Gösterilmesi.....	33
4.7. Kısmi Gen Dizileme Analizi.....	34
4.8. Deneysel Enfeksiyon.....	34
4.8.1. Balıklar.....	34
4.8.2. Deneysel Enfeksiyonlar İçin Virüslerin Hazırlanması.....	35
4.8.3. Deneme Tanklarının Hazırlanması ve Deney Tasarımı.....	35
4.9. Filogenetik Analiz.....	38
5. BULGULAR.....	39
5.1. Hücre Kültüründe Virüs İzolasyonu.....	39
5.2. RT-PZR Amplifikasyonu.....	39
5.3. Virüs Nötralizasyon Testi.....	40
5.4. Virüsler.....	40
5.5. Deneysel Enfeksiyon.....	41
5.6. Filogenetik Analiz.....	49

6. TARTIŞMA.....	59
7. KAYNAKLAR.....	67
8. ÖZGEÇMİŞ.....	73

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Viral hemorajik septisemi virüsün genotipleri.....	9
Tablo 2.	Çeşitli dezenfektanların VHSV üzerine virüsidal etkileri.....	22
Tablo 3.	Tarama çalışması süresince belirtilen bölgelerden yakalanan deniz balığı türlerinden alınan örnekler.....	26
Tablo 4.	Tarama çalışması süresince belirtilen bölgelerdeki alabalık işletmelerinden alınan örnekler.....	27
Tablo 5.	Tarama çalışması süresince örnek alınan alabalık işletmelerinin illere göre dağılımı.....	27
Tablo 6.	RT-PZR amplifikasyonunda kullanılan primerler.....	33
Tablo 7.	Enfeksiyon denemesinde kullanılan ve tarama çalışmasında izole edilen VHSV İzolatları.....	41
Tablo 8.	Filogenetik analizlerde kullanılan izolatlar.....	50
Tablo 9.	BioEdit genetik analiz programı kullanılarak yapılan çoklu hizalama (multiple alignment) tablosu.....	51
Tablo 10.	Çoklu hizalama işlemine tabi tutulduğunda ckc5 izolatında dikkati çeken mutasyon bölgeleri.....	53
Tablo 11.	RNA kodon tablosu.....	54
Tablo 12.	BioEdit genetik analiz programı kullanılarak hazırlanan çoklu hizalanmış protein dizilimleri.....	55

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** *Rhabdoviridae* ailesine ait virüslerin N (nükleoprotein) geni kısmi DNA dizi analizine göre neighbor-joining metoduyla yapılmış filogenetik ağacı.....7
- Şekil 2.** Viral hemorajik sepsisemi virüsü'nün elektron mikroskopik görüntüsü.....8
- Şekil 3.** Viral hemorajik sepsisemi virüsünün genom haritası.....8
- Şekil 4.** Viral hemorajik sepsisemi virüsünün kısmi G geni sekansına (nt 361'den 720'ye) göre şekillendirilmiş filogenetik ağacı.....9
- Şekil 5.** Örnekleme noktalarının harita üzerinde gösterimi.....25
- Şekil 6.** Deneyde kullanılan balıklar.....34
- Şekil 7.** Deneme ünitesinin şematik olarak gösterimi.....37
- Şekil 8.** Deneme ünitesinin fotografik görünümü.....37
- Şekil 9.** RT-PZR çalışması sonucunda elde edilen 587 bç uzunluğundaki bantların UV ışığı altındaki görünümü40
- Şekil 10.** Enfeksiyon denemelerinde kalkan balıklarında görülen klinik bulgular.....43
- Şekil 11.** İntraperitoneal enjeksiyon yoluyla yapılan enfeksiyon denemeleri sonucu meydana gelen ölüm oranları.....44
- Şekil 12.** İmmersiyon yoluyla yapılan enfeksiyon denemeleri sonucu meydana gelen ölüm oranları.....44

Şekil 13.	Kalkan balıklarında (<i>Psetta maxima</i>) İP enjeksiyon yoluyla yapılan enfeksiyon denemesine ait yüzde kümülatif mortalite değerleri.....	45
Şekil 14.	Kalkan balıklarında (<i>Psetta maxima</i>) İM yoluyla yapılan enfeksiyon denemesi.....	46
Şekil 15.	Karadeniz dere alabalığında (<i>Salmo trutta Labrax</i>) İP enjeksiyon yoluyla yapılan enfeksiyon denemesi.....	47
Şekil 16.	Karadeniz dere alabalığında (<i>Salmo trutta Labrax</i>) İM yoluyla yapılan enfeksiyon denemesi.....	48
Şekil 17.	Nükleotit dizilimindeki mutasyon bölgelerinin aa diziliminde meydana getirdiği değişimler.....	56
Şekil 18.	Neighbor-Joining metoduyla çizilmiş olan bootstrap konsensus filogenetik ağacı.....	57
Şekil 19.	Neighbor-Joining metoduyla çizilmiş olan bootstrap konsensus filogenetik ağacı.....	58
Şekil 20.	Epitop bölgesindeki mutasyonlar.....	65

KISALTMALAR LİSTESİ

µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
aa	: Amino asit
BF-2	: Bluegill fry-2
bç	: Baz çifti
BVKAE	: Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü
°C	: Santigrat derece
CEFAS	: İngiltere Çevre, Balıkçılık ve İngiltere Akuakültür Merkezi
CHSE-214	: Chinook salmon embriyo
cm	: Santimetre
CMC	: Cell mediated cytotoxicity
CPE	: Sitopatik etki
CTL	: Sitotoksik T lenfositleri
DEPC	: Diethylpyrocarbonate
DFVF	: Danimarka Gıda ve Veteriner Araştırma Enstitüsü
dk	: Dakika
DKID₅₀	: Doku kültürü enfektif doz %50
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acide
EPC	: Epithelioma papulosum cyprini
FBS	: Fetal bovine serum
FHM	: Fathead minnow

g	: Gram
HEPES	: 4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazineethanesulfonic acid
HIRRV	: Hirame rhabdo virus
IHNH	: İnfeksiyöz hematopietik nekrozis hastalığı
IHNV	: İnfeksiyöz hematopietik nekrozis virüs
IL-1β	: İnterlöykin-1 β
IPNH	: İnfeksiyöz pankreatik nekrozis hastalığı
IU	: İnternasyonal unite
İM	: İmmersiyon
İP	: İnteraperitoneal
kg	: Kilogram
L	: Large geni
lt	: Litre
M	: Matrix proteini geni
MEM	: Minimum esansiyel medium
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimol
M-MuLV	: Moloney murine leukemia virus
Mx	: Myxovirus rezistans proteini
N	: Nükleoprotein
NK	: Doğal öldürücü
NKEF	: Natural killer enhancing factor
NO⁻	: Nitrik oksit

nt	: Nükleotit
Nv	: Non-virion
OIE	: Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
P	: Fosfoprotein geni
pH	: Hidrojen iyon konsantrasyonu
pmol	: Pikomol
ppm	: Parts per million
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Round per minute
RTG-2	: Rainbow trout gonad-2
RT-PZR	: Tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu
SHRV	: Sneak head rhabdo virus
sn	: Saniye
SVCH	: Sazanların bahar viremisi hastalığı
SVCV	: Sazanların bahar viremisi virüsü
TAE	: Tris-acetate EDTA
Taq	: Thermus aquaticus
TNF-α1	: Tümör nekrozis faktör α 1
U	: Ünite
VHS	: Viral hemorajik septisemi
VHSH	: Viral hemorajik septisemi hastalığı
VHSV	: Viral hemorajik septisemi virüs

1. ÖZET

Viral hemorajik septisemi hastalığı (VHSH) tüm dünyada, balıklarda yaygın olarak görülen önemli bir viral hastalıktır. Bu tezin amacı Karadeniz bölgesindeki balıklardan viral hemorajik septisemi virüs (VHSV)'ün izolasyonu ve izole edile virüslerin patojenitelerinin belirlenmesidir. Bu amaçla, öncelikle Karadeniz kıyısı boyunca 12 deniz balık türünde 3378 balıktan ve 62 alabalık işletmesinden alınan 2589 adet gökkuşacağı alabalığından örnekler toplandı. Bu örneklerden elde edilen RNA'lar kullanılarak VHSV'nin varlığı tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile belirlendi. Daha sonra virüs varlığı belirlenen örneklerden, hücre kültüründe virüs izolasyonu gerçekleştirildi. Ayrıca, elde edilen bu virüslerin genomik kimliklendirilmeleri ve patojenik güçleri belirlendi. RT-PZR sonucunda yalnızca beş kalkan balığında VHSV RNA varlığı tespit edildi. Bu kalkan balıklarından izole edilen virüslerin patojenite çalışmaları sonucunda dördünün kalkan balıklarında oldukça patojenik oldukları kaydedildi. Bir izolatın ise patojenik olmadığı görüldü. Alabalıklarda ise kalkan balıklarından izole edilen tüm izolatların patojenik olmadığı belirlendi. Yapılan DNA dizi analizi sonucu tüm izolatların genogrup I içerisinde yer aldığı kaydedilmiştir. Bu çalışma sonucunda VHSV'nin Karadeniz kalkanında endemik olduğu kaydedildi. Bu çalışmanın verilerine göre, bu hastalığın Karadenizde son yıllarda kalkan balığı stoklarındaki azalma ile bir ilişkisi olabileceği ve bu nedenle VHSV ile ilgili daha detaylı ve kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiğini önermekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Viral hemorajik septisemi hastalığı (VHSH), virüs izolasyon, sörvey, DNA dizileme, mortalite.

2. ABSTRACT

Viral haemorrhagic septicemiae (VHS) is an important viral disease which is commonly seen in fishes around the world. The aim of this thesis was to isolate viral haemorrhagic septicemiae virus (VHSV) from fish living in the Black Sea region and to determine pathogenicity of the isolates. For this purpose, samples were collected from 3378 fish from 12 species in the Black Sea coast and 2589 rainbow trouts from 62 aquaculture farms in this region. Presence of VHSV was determined by using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from the RNA samples isolated from fish tissues. Later, the virus isolation from cell culture was performed from the VHSV detected samples by RT-PCR. Additionally, genomic identification and pathogenicity of the viruses were studied. RNA of VHSV was detected from five turbot only. In the pathogenicity tests, four of the virus isolates were found very pathogenic on turbot. On the other hand, one of the isolates was found not pathogenic. All the isolates were seen not to be pathogenic on trouts. According to the DNA sequence analysis, all the isolates were recorded to belong to genogroup I. In conclusion, VHS was found to be endemic in Black sea turbot. We suggest that there may be a relation between VHS and reduce in the turbot stocks in the Black sea in recent years. It is therefore required to conduct detailed studies on VHSV in order to have a better understanding of the epidemiology of the disease.

Key Words: Viral Haemorrhagic Septicemiae (VHS), virus isolation, survey, DNA sequencing, mortality.

3. GİRİŞ

Viral hemorajik septisemi (VHS) balık viral hastalıklarının en önemlisidir. Yaş ve genetik farklılıklara bağlı olarak VHS'nin mortalitesi yavru (juvenil) ve parmakboy (fingerling) balıklarda %80-100 oranında olabilmektedir. İki kg ve üstü balıklardaki mortalite daha düşük olmakla beraber toplamda %50 mortaliteye ulaşabildiği belirtilmektedir (56). Viral hemorajik septisemi hastalığı (VHSH)'nin Avrupa balık yetiştiriciliğine olan zararı 1991 yılındaki bir çalışmaya göre yaklaşık 40 milyon Pound seviyesindedir. Danimarka'da 2000 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada ise sadece iki gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmesinde görülen VHSH vakasının zararı 211.000 Avro olarak tahmin edilmiştir (56, 64).

Viral hemorajik septisemi virüs (VHSV)'ün tatlı su ve deniz izolatlarının patojeniteleri arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır, bu nedenle yürürlüğe konacak yasal düzenlemeler hazırlanırken tatlı su ya da deniz izolatlarının ayrı değerlendirilmesi üzerinde düşünülen bir konudur (64). Bu ayrımın yapılmasına yönelik uygulanabilir yöntemler üzerinde çalışmalar devam etmektedir.

Viral hemorajik septisemi virüs hastalığı, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) tarafından en tehlikeli viral balık hastalıkları arasında listelenmiştir. Ülkemizde ise infeksiyöz hematopietik nekrozis hastalığı (IHNH), sazanların bahar viremisi hastalığı (SVCH), viral hemorajik septisemi hastalığı (VHSH) ve infeksiyöz pankreatik nekrozis hastalığı (IPNH), Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın 1 Nisan 2004 tarihli ve 2004/14 sayılı tebliğinde ihbarı mecburi hastalıklar olarak kabul edilmiştir (10).

Ülkemizde, OIE tarafından hazırlanan ve Avrupa Birliği ülkelerinin uygulamaya koydukları “Aquatic Animal Code” temel alınarak, yeni mevzuat hazırlama çalışmalarına Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü bünyesinde 2009 yılında başlanmıştır.

Bu tezde Karadeniz bölgesinde doğal ve kültürü yapılan balıklardan VHSV'nin izolasyonu ve izole edilen virüslerin virülensinin tespiti ile moleküler epidemiyolojisinin araştırılması amaçlanmıştır.

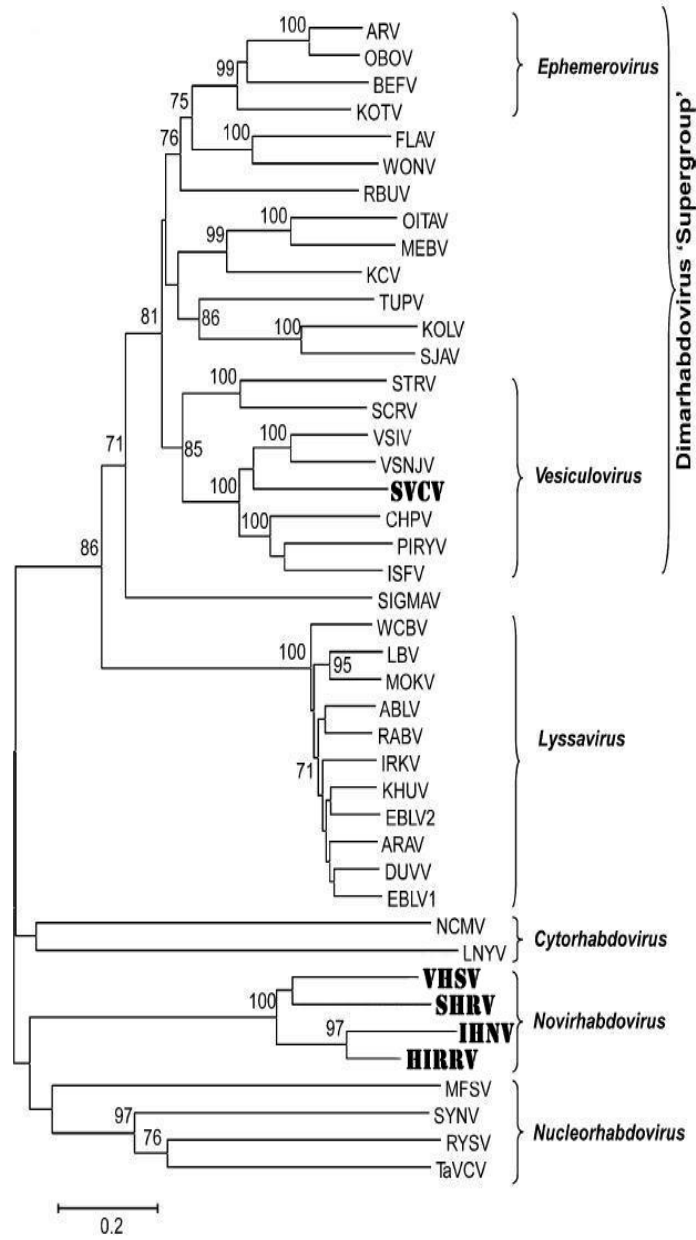
3.1. Etiyoloji

Balıklarda hastaık oluşturan virüsler 10 farklı ailede yer almaktadır. Bunlardan iki tanesi DNA genoma sahip *Iridoviridae* ve *Herpesviridae* aileleri, diğer sekiz tanesi ise RNA genoma sahip *Picornaviridae*, *Birnaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Retroviridae* ve *Coronaviridae* aileleridir (30).

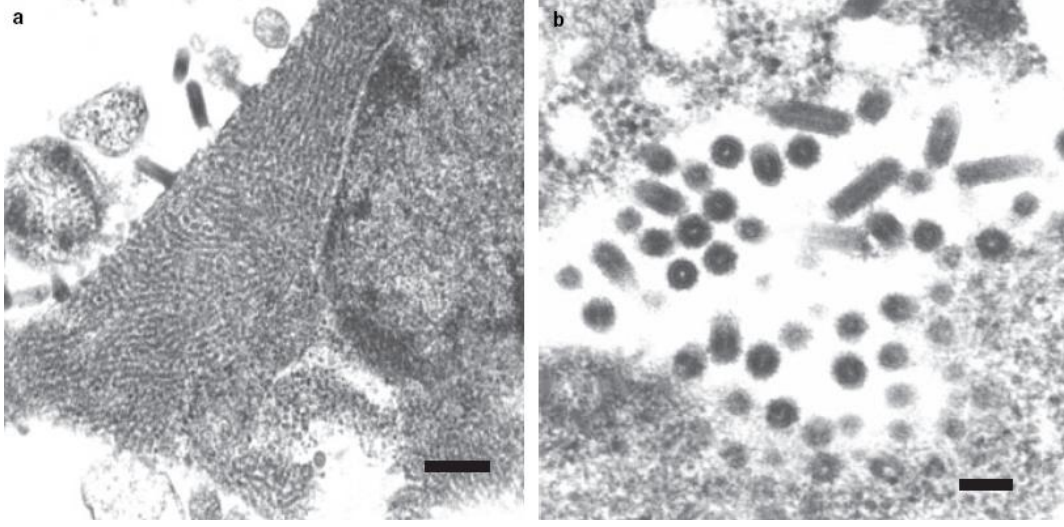
Viral hemorajik septisemi hastalığı, segmentsiz, negatif iplikli, 11.158 nükleotit uzunluğunda bir RNA virüsü olan VHSV tarafından meydana getirilmektedir. Bu virüs, *Rhabdoviridae* ailesinin Novirhabdovirus genusunda bulunur (Şekil 1) (14, 62, 63, 64). Virüs 60-75 nm genişliğinde ve 170-180 nm uzunluğunda olup tipik mermi şeklindedir (Şekil 2) (9, 21). VHSV, 3'-N-P-M-G-Nv-L-5' düzeninde yerleşmiş olan N (nükleoprotein), P (polimerazla ilişkili fosfoprotein), M (matriks proteini), G (glikoprotein), L (RNA ya bağlı RNA polimeraz) olmak üzere beş adet yapısal ve G ile L geni arasında yerleşmiş bir adet Nv (non-virion) geni olmak üzere toplam altı gene sahiptir (Şekil 3). Virüsün

G proteini enfekte hayvanlarda nötralizan antikorların oluşumundan sorumlu olan proteindir (15, 20, 54, 62).

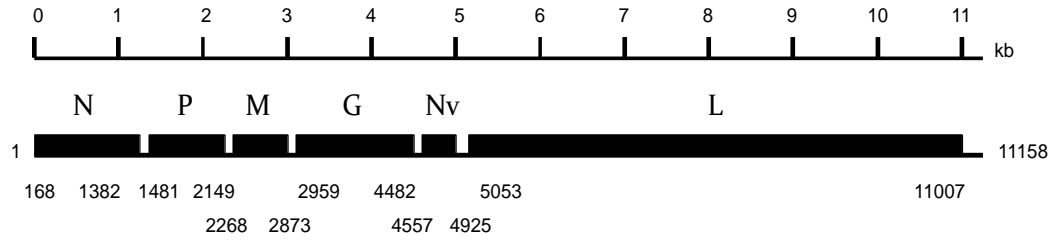
Balıklarda hastalık yapan *Rhabdovirus*'lardan sadece sazanların bahar viremi virüsü (SVCV) Vesiculovirus genusundandır ve Novirhabdovirus genusuna ait olanlardan farklı olarak Nv geni ihtiva etmez. Nv geninin işlevi tam olarak anlaşılmamış olmakla beraber yapılan çalışmalarda alabalıklarda patojeniteden doğrudan doğruya ilişkili olduğuna ait veriler elde edilmiştir. Nv geni çıkarılmış bir IHNV mutantıyla enfekte edilen hücrelerde virüsün çoğalması ciddi biçimde etkilenmiştir. Viral proteinlerin sentezinin belirgin derecede Nv delesyonundan etkilendiği görülmüştür (6, 16, 39, 73).



Şekil 1. *Rhabdoviridae* ailesine ait virüslerin N geni kısmi DNA dizi analizine göre neighbor-joining metoduyla yapılmış filogenetik ağacı. Koyu karakterle yazılmış olanlar balıklarda hastalık yapan virüslerdir (44).



Şekil 2. Viral hemorajik septisemi virüsü'nün elektron mikroskobik görüntüsü. a) FHM hücre hattında tomurcuklanan olgun virionlar (bar:200 nm), b) stoplazmadaki zarsız virionlar (bar:100 nm) (21).

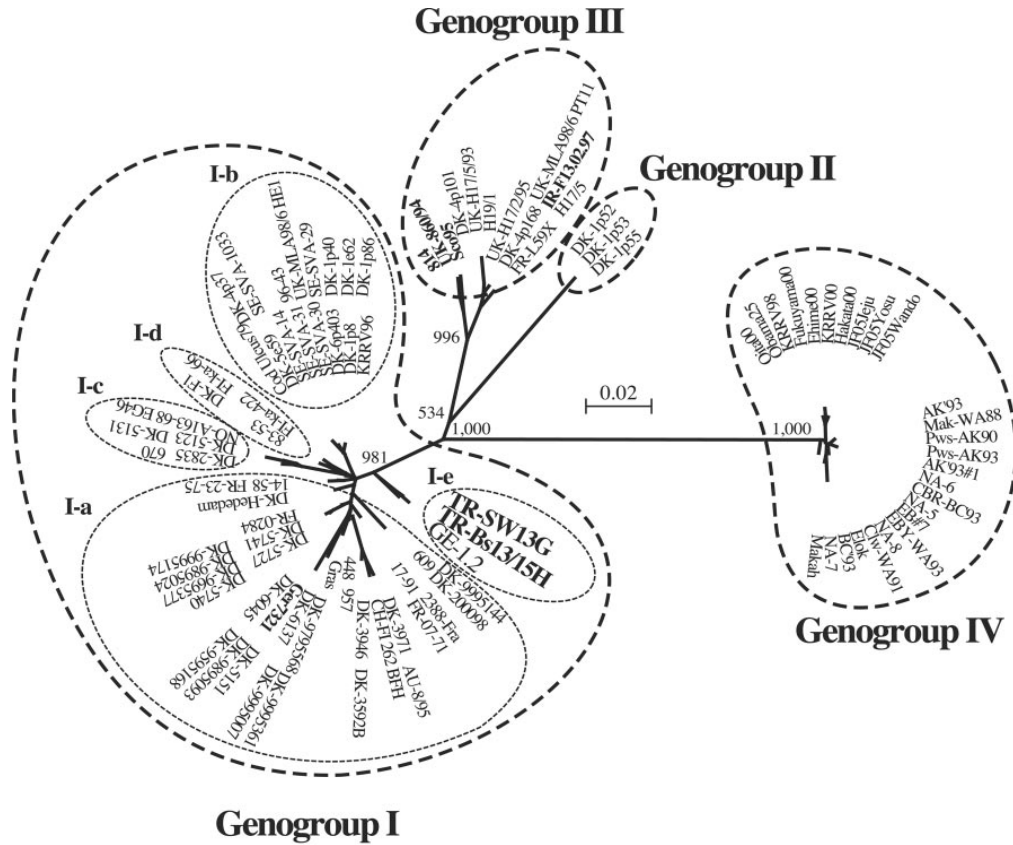


Şekil 3. Viral hemorajik septisemi virüsünün genom haritası (62).

Viral hemorajik septisemi virüsü izolatları üzerinde yapılan filogenetik analizler virüsün dört farklı genotipinin bulunduğunu göstermiştir (Tablo 1, Şekil 4) (9, 44, 55, 63).

Tablo 1. Viral hemorajik septisemi virüsün genotipleri (9, 55).

Genotip	İzole edildiği yerler/türler
I	Avrupa kıtasındaki gökkuşağı alabalığı işletmelerinden izole edilmiş olan izolatlar (<i>Ia genogrubu</i>). Baltık denizi, Skagerrak, Kattegat bölgelerindeki deniz izolatları (<i>Ib genogrubu</i>). Çoğunluğu Danimarka sularındaki gökkuşağı alabalığı işletmelerinden izole edilen izolatlar (<i>Ic genogrubu</i>). Danimarka'da hem cod hemde gökkuşağı alabalıklarından izole edilen izolatlar (<i>Id genogrubu</i>). Gürcistan'dan Gökkuşağı alabalığı izolatı (GE-1.2) ve Türkiye'de kalkan balıklarından izole edilen (TR-WS13G, TR-Bs13/15H) izolatlar (<i>Ie genogrubu</i>).
II	Baltık denizindeki deniz izolatları.
III	Britanya adalarının izolatları.
IV	Kuzey Amerika ve Japonya izolatları.



Şekil 4. Viral hemorajik septisemi virüsün kısmi G geni sekansına (nt 361'den 720'ye) göre şekillendirilmiş filogenetik ağacı (55).

3.2. Epidemiyoloji

Viral hemorajik septisemi hastalığının çıkması için su sıcaklığı önemli bir çevresel faktördür. Hastalık daha çok 4-14°C arası sıcaklıklarda görülür, 15°C'nin üzerindeki sıcaklıkların virüsün çoğalması üzerine olumsuz etki yaptığı bildirilmektedir. Yüksek sıcaklıklarda hastalık nadiren görülürken düşük sıcaklıklarda (1-5°C) genellikle uzayan bir hastalık sürecinde yüksek mortalite gözlenir. Hastalık yılın her mevsiminde gözlenmekle beraber salgınlar genellikle su sıcaklıklarında dalgalanmaların olduğu ilkbahar dönemlerinde daha çok görülür (2, 9). Viral hemorajik septisemi virüsü partiküllerinin tatlı ve tuzlu su ortamlarında 40 güne kadar enfektivitesini kaybetmeden kalabildiği bildirilmiştir (67).

Diğer viral hastalıklarda olduğu gibi VHSŞ'de de stres, patojenite ve epidemileri etkileyen önemli bir faktördür. Enfeksiyonu atlatan balıklarda virüs gizli kalabilir ve ileride gerçekleşebilecek bir stres faktörüyle beraber virüs saçılımı söz konusu olur (2, 33, 42, 63, 67).

Enfeksiyonun seyri balığın yaşıyla ilişkilidir. Özellikle gökkuşağı alabalıklarında yavrular enfeksiyona daha duyarlıyken, balık büyüdükçe dirençte artmaktadır (9).

Klinik bulguları VHSŞ'ye benzeyen ilk vaka bildirimini Schäperclaus (1938) tarafından rapor edilmiş ve "Nierenschwellung" (şişkin böbrek) sendromu olarak tarif edilmiştir. Benzer vakalar Güney Polonya'da Pliszka (1946) tarafından bildirilmiştir. Bin dokuz yüz ellili yılların başlarında Danimarka'da (Schäperclaus, 1954; Rasmussen, 1965), hemen sonrasında Fransa'da (Besse, 1955) "şişkin böbrek sendromu" rapor edilmiştir. Bin dokuz yüz ellili yılların

ortalarına gelindiğinde sendromun enfeksiyöz karakterde olduğu bilinirken viral etioloji henüz bilinmemektedir. Hastalığın etiyojisi ancak Jensen tarafından 1963 yılında alabalık hücre hattında virüsün izole edilmesi ile aydınlığa kavuşmuştur. Etiyojinin ilk günışığına çıkışının ardından, izolasyonun yapıldığı Danimarka'daki Egtvet köyünün adı virüse verilerek hastalık "Egtvet virüs sendromu" olarak tanımlanmıştır (52, 64).

Viral hemorajik septisemi virüsü 1988 yılına kadar yalnızca tatlı su balık türlerini enfekte eden bir etken olarak bilinmekteydi. Kuzey Amerika'da 1988 yılında chinook ve coho salmon balıklarından, daha sonradan Kuzey Amerika'da en az 18 farklı balık türünden de izole edilmiştir. Denizden 1980'li yıllarda ilk VHSV izolasyonunun ardından Kuzey Amerika, Asya ve Avrupa'dan en az 48 farklı türden daha VHSV belirlenmiştir. Yalnızca Kuzey Avrupa'dan ringa, çaça balığı, morina, Norveç yayın balığı ve yassı balıkları da içine alan 15 türden VHSV izole edilmiştir. İzolasyonların çoğu Baltık Denizi, Kattegat, Skagerrak, Kuzey Denizi ve İskoçya civarındaki sulardan gerçekleştirilmiştir (27).

Asya kıtasındaki ilk izolasyon ise Japonya ve Kore'de Japon dil balığından "*Paralichthys olivaceus*" 2001 yılında gerçekleştirilmiştir (70, 78). Amerika'daki deri ülserleriyle karakterize klinik belirtili cod balıklarından VHSV izolasyonunun ardından, Avrupa'da da deniz balığı türlerinde 1993-1995 yıllarında bir tarama başlatılmış, bunun sonucunda İskoçya ve Kuzey Denizi'nde yabani cod ve haddock balıklarından da izole edilmiştir. Bu izolasyonların ardından Danimarka Gıda ve Veteriner Araştırma Enstitüsü (DFVF) ile İngiltere Çevre, Balıkçılık ve İngiltere Akuakültür Merkezi (CEFAS) tarafından deniz balıklarında virolojik incelemeler yapılmış ve bu incelemelerin sonucunda Atlantik herring "*Clupea*

harengus”, sprat “*Sprattus sprattus*”, Atlantik cod “*Gadus morhua*” ve four-beard rockling “*Enchelyopus cimbrius*” türlerinden VHSV tespit edilmiştir (52, 64). Avrupa’da, 1999 yılından 2005 yılına kadar uzayan süreçte özellikle Baltık Denizi, Kuzey Denizi ve Norveç kıyılarında olmak üzere 69 farklı deniz balığı türünden 50.000’in üzerinde örnek toplanarak VHSV taraması yapılmış ve 193 adet VHSV izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu tarama çalışmalarının sonucunda en az 15 tür balığın VHSV için rezervuar türler oldukları görülmüştür. Bununla birlikte en fazla izolasyon sprat, herring ve Norveç pout balıklarından gerçekleştirilmiştir (52, 64). Japonya’da 2002 yılında yapılan bir taramada dokuz farklı deniz balığı türünde VHSV varlığı araştırılmış, bunlardan Japon dil balığı (*Paralytica olivaceus*) ve neşter balığı (*Ammodytes personatus*) türlerinden VHSV izolasyonu yapılmıştır (79).

3.3. Klinik Belirtiler

Hastalık en hassas tür olan gökkuşağı alabalıklarında, organların endotelial katmanın yıkımıyla karakterizedir. Beyinde, seröz yüzeylerde, kaslarda, sindirim organlarında ve gözde hemoraji, ekzoftalmus, renkte kararma ve soluk renkteki solungaçlar enfeksiyonun genel belirtileridir. Bazı vakalarda asites gözlenmektedir. Hasta balıklar yavaş hareket eder ve letarjik görünümündedir. Kronik vakalarda renkte koyulaşma ve anormal yüzme davranışları gözlenebilir. Mortalite yaşla ilişkili olup larval dönemde %100'lere ulaşabilmesine karşın ergin balıklarda %30-70 arasında gözlenmektedir (36, 64).

Kimi araştırmacılar, Fransa ve Danimarka’da denizde yetiştirilen gökkuşağı alabalıklarda yaptıkları çalışmada, enfekte balıklarda ekzoftalmus, deride,

gözlerde, solungaçlarda, kaslarda, hava kesesinde, karaciğerde, gonadlarda ve karın yağ dokusunda hemorajiler gibi hastalığa özgü klinik belirtileri ile %15-50 oranında mortalite gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca bu vakalardaki enfeksiyonun muhtemelen tatlı sudan gelen VHSV'den kaynaklandığını belirtmişlerdir (64).

3.4. Patogenez

Rhabdovirus lar glikoproteinleri aracılığıyla hücre yüzeyindeki reseptöre tutunup endositoz yoluyla stoplazmaya dahil olmaktadır (30).

İmmersiyon yoluyla yapılan bir enfeksiyon çalışmasında, bir saat süreyle gerçekleştirilen virüs uygulamasının ardından aynı gün solungaçlarda, birinci günün sonunda böbrek, dalak ve deride, üçüncü gün tüm dokularda VHSV teşhis edilmiştir. Dördüncü haftaya gelindiğinde solungaçlar, kalp, beyin ve kan hariç diğer dokularda VHSV teşhis edilememiştir. Deneyin altıncı haftasında yalnızca kalp ve beyinde virüs varlığı belirlenmiş, yedinci haftada ise hiçbir dokuda VHSV tespit edilememiştir. Hayatta kalan balıklar çeşitli stres faktörlerine maruz bırakıldığında, sıcaklık stresi uygulanan balıkların kalplerinden yeniden virüs izolasyonu yapılabilmektedir. Kalp dokusu VHSV için muhtemel saklanma yeri olarak kabul edilmektedir (45).

Araştırmacılar VHSV ile enfekte olan ve hayatta kalan balıklarda virüsün uzun süreli varlığını göstermişlerdir. İnvitro persistensin bazı parametrelerle ilişkisi bulunmaktadır. Bunlar; viral mutantın ısı duyarlılığı, küçük plak viral mutant ve defektif interfere edici viral partiküllerdir. Viral hemorajik septisemi virüsünün EPC hücre hattında hücreden hücreye geçişte hücre zarı füzyonunu

glikoprotein aracılığıyla yaptığı, pH (5,6) ve ısıyla (14°C) füzyonun ilişkili olduğu belirlenmiştir (5, 29, 48, 60). Gökkuşığı alabalıklarında VHSV ve IPNV enfeksiyonunun lenfoid hücrelerde apoptozis mekanizmasını harekete geçirdikleri gösterilmiştir (22).

Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika deniz VHSV izolatlarının, gökkuşığı alabalıkları üzerinde immersiyon yoluyla yapılan ve 30 gün sürdürülen enfeksiyon denemesi neticesinde, izolatların non-patojenik veya düşük patojenitede oldukları görülmüştür. Yine gökkuşığı alabalıklarında, Kuzey Avrupa deniz izolatları ile karın içi yolla yapılan enfeksiyon denemelerinde mortalite gözlenmezken, Kuzey Amerika izolatlarıyla yapılan denemelerde %20 civarında mortalite gözlenmiştir. Bu oran normalde tatlı su denemelerinde alınan sonucun yaklaşık yarısı kadardır (64).

Kuzey Atlantik okyanusu ile Kuzey ve Baltık denizlerinde hem hastalık belirtileri gösteren hemde göstermeyen balıklardan (yaklaşık 45 balık türü) VHSV izole edilmiştir. Deniz balıklarından izole edilen VHSV izolatlarının hem deniz türlerinde hemde tatlı su türlerinde patojeniteleri farklılık göstermektedir (71). Bir VHSV salgınından sonra hayatta kalan balıklar asemptomatik taşıyıcı olarak değerlendirilirler (2, 33, 42, 63, 73). Larval dönemdeki Pasifik Herring "*Clupea pallasii*" balıklarının enfeksiyona karşı yüksek duyarlılıkta oldukları fakat metamorfozlarını tamamlayanların (bazı balık türlerinde balığın erişkin formuna kavuşurken geçirdiği morfolojik değişimleri ifade eden süreç metamorfoz olarak tanımlanmaktadır) kısmen korundukları belirtilmektedir (11, 34).

Viral hemorajik septisemi virüsünün makrofajlarda bulunduğu ve burada replike olduğu bilinmektedir (69). Viral hemorajik septisemi virüsü patogenezinin

ortaya konulmasına yönelik olarak yapılan kalkan balıklarındaki in vivo enfeksiyon denemelerinde ön böbrekte oksijen ara ürünleri etkinliği (respiratory burst activity) ve plazma NO⁻ konsantrasyonunda önemli bir artış gözlenmemiştir (69). Alabalıklarda dalak, böbrek, kan ve timusdan alınan lökositlerde viral replikasyon gösterilmiştir. Deneysel yolla lökositleri azaltılmış alabalıkların VHSV'ye duyarlılığının azaldığı belirtilmektedir (68).

Atlantik cod "*Gadus morhua* (L.)" ve Atlantik halibut "*Hippoglossus hippoglossus* (L.)" balıklarının, immersiyon yoluyla yapılan enfeksiyon denemelerinde dört farklı genogruptan olan VHSV izolatlarına karşı da duyarlı olmadıkları görülmüştür (67). Atlantik herring balıklarından izole edilmiş olan VHSV 96-43 izolatıyla alabalıklarda yapılan enfeksiyon denemesinde virüs avirulent bulunmuştur. Bu izolatın alabalıklarda patojen olan Heddam izolatıyla amino asit sekansında %98,6'lık benzerliği bulunmasına karşın patojeniteleri arasında çok büyük fark mevcuttur. Ancak farklılığın hangi gen bölgelerindeki değişimlerden kaynaklandığı tam olarak anlaşılabilmiş değildir (13).

Farklı VHSV izolatlarıyla yapılan enfeksiyon denemesinde intraperitoneal (İP) enjeksiyon yapılan gruplarda yüksek mortalite gözlenirken aynı durum immersiyon yoluyla virüs verilen gruplarda sözkonusu değildir. Bununla beraber immersiyon uygulaması yapılan balıklarla birlikte barındırılan (kohabitasyon) gruplarında mortalite gözlenmiştir. Bu durum immersiyon yoluyla verilen balıklarda virüsün persiste hale geldiğini ve bu balıkların saçtığı virüsün, sonradan ilave edilen birlikte barındırma grubu için daha virulent hale geldiği tezi ile açıklanmaktadır (77).

3.5. Patoloji

Bu hastalıkta en belirgin patolojik bulgular miyokarttaki pek çok fiberde karyoreksis, karyopiknoz ve yoğun yangı hücreleriyle beraber litik miyofibrillerin mevcudiyetidir. İlave olarak epikard ödemli bir hal almıştır ve yoğun yangı hücreleri ihtiva eder.

Böbrekler, dalak ve karaciğerde ödem, nekrotik odaklar, hemorajiler ve yangı hücresi infiltrasyonları gözlenmektedir (36).

Kültürü yapılan kalkan balıklarındaki bulgular, VHSV izolasyonu ile ilişkili olarak alabalıklarda gelişen klasik bulgulara benzer seyretmektedir; bu bulgular ekzoftalmus, deride, gözlerde, seröz yüzeylerde hemorajilerdir. İskoçya'daki bir kalkan izolatu ile yapılan enfeksiyon denemesi virüsün kalkan balıklarında yüksek mortalite oluşturduğunu göstermiştir. Yapılan enfeksiyon denemesinde kalkan balıklarında kaslardaki hemorajiler dışında diğer klasik VHSV patolojisi gözlenmiştir. Histopatolojik olarak dalakta nekroz, böbrek ve diğer intestinal organlarda hemorajiler göze çarpmaktadır. Deneysel enfekte edilmiş kalkan balıklarında diğer önemli hastalık belirtileri; baş ve yüzgeçlerde hemorajiler ile asitestir (64).

Patolojik bulgu göstermeyen bir yaşın üzerindeki deniz balıklarının enfeksiyonu nasıl aldıkları, hangi dönemde yakalandıkları ve taşıyıcı olarak hayatta kalıp kalmadıkları konusundaki bilgiler oldukça sınırlıdır. Şu anki bilgiler latent enfekte bireylerle aktif enfeksiyonun devam ettiği bireylerin ayırımına imkan vermemektedir. DFVF tarafından çok sayıdaki örnek üzerinde yapılan incelemelerde, hücre kültürüne ilk ekimde 172 VHSV pozitif örnekten 101'inin (%59) belirgin sitopatik etki (CPE), 27 örneğin ise çok zayıf bir CPE gösterdiği

belirlenmiştir. Bu bulgular enfeksiyonun teşhis limiti civarında oldukça düşük seviyedeki enfektif virüs tarafından gerçekleştirildiğini göstermektedir. Klinik olarak enfekte edilen balıklardan yapılan hücre kültürüne ekimlerde 24-48 saat içerisinde CPE gözlenmektedir (64).

Kuzey Amerika'da, 1995 yılından beri deniz balıklarında yoğun ölümler rapor edilmiştir. Bununla beraber yapılan bir çalışmada VHSV pozitif ölü deniz balıkları patolojik değişiklikler bakımından incelenmiş ve hastalığa ait patolojik bulgular tespit edilememiştir. Avrupa'dan VHSV izole edilen deniz balıklarında yoğun ölümler rapor edilmemiştir (64).

3.6. Teşhis

Virüs izolasyonu, diğer viral hastalıklarda olduğu gibi VHS hastalığının teşhisi içinde en geçerli yöntemlerin başında gelmektedir. Virüs izolasyonu için önerilen hücre hatları özellikle BF-2 (Bluegill Fry) ve RTG-2 (Rainbow Trout Gonad) hücreleri olmakla beraber CHSE-214 (Chinook Salmon Embriyo) hattının da VHSV'ye duyarlıdır (9). Japon dil balığı "*Paralichthys olivaceus*" izolatının en iyi FHM (Fathead Minnow) ve EPC (Epithelioma Papullosum Ciphyni) hücre hatlarında üredikleri bildirilmiştir. Hücre kültüründe 15°C'lik (15-20°C) inkübasyon ısıları önerilmektedir (67).

Viral hemorajik septisemi virüsünün hücreden hücreye geçişi pH ve glikoprotein ile ilişkilidir. Düşük pH (< pH 7) değerinin hücreden hücreye geçişi inhibe ettiği bildirilmektedir (5). pH değeri yeniden yükseltildiğinde (\geq pH 7,5) inhibisyonun ortadan kalktığı gösterilmiştir. Buna göre hücre kültüründe virüsün

üremesindeki hatalı negatif sonucun pH değeriyle ilgili olabileceği ifade edilmektedir (48).

Monoklonal antikorlar kullanılarak hazırlanmış enzim ilişkili immün test (ELISA), immunofloresan ve immunoperoksidaz kitleri ticari olarak (Bio-X Diagnostics, Test-Line Diagnostics) üretilmektedir (42, 50, 53).

Viral hemorajik septisemi virüsü teşhis metotlarının kıyaslandığı bir çalışmada; hücre kültürü, iki aşamalı (nested) tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile southern blot analizi teşhis duyarlılıkları bakımından karşılaştırılmış ve bunlar arasında nested RT-PZR diğerlerine göre daha duyarlı bulunmuştur (41, 76). Ayrıca deniz ve tatlı su izolatlarını birbirinden ayırabilmek için yapılan restriction fragment length polymorphism (RFLP) çalışmalarında *BseSI*, *BtsI* ve *HincII* enzimleri ile çalışıldığında her dört genogrubunda birbirinden ayrılabilirdiği gösterilmiş, bununla beraber patojenitelerine göre bir ayırım henüz ortaya konulamamıştır (13, 37).

3.7. Bağışıklık

Balıkların immün mekanizmaları tam anlaşılammış olmakla beraber VHSV enfeksiyonu oldukça iyi çalışılmış ve son yıllarda deneysel çalışmalarda bu virüse etkili olan aşılarda geliştirilmiştir (1, 49). Viral hemorajik septisemi virüsünün G proteini alabalıklarda nötralizan antikorların oluşumunu ve T lenfositlerinin immunoproliferasyonunu indükleyen proteindir. Fakat rekombinant G proteiniyle (*Escherichia coli*, *Aeromonas salmonicida* ve *Yersinia ruckeri* bakterilerinde açıklatılmış) yapılan aşılarda zayıf koruyuculuk görülmektedir.

Yalnızca böcek ya da küf hücrelerinde açıklatıldığında orta seviyede bir bağışıklık sağlamıştır (4, 7, 59).

Hastalığa daha duyarlı olan genç balıklar enjeksiyon yapmak için çok küçük olmaları sebebiyle immersiyon yöntemi üzerinde çalışılmış ve kısa ultrason dalgaları eşliğinde yapılan immersiyon aşılmasının çok daha etkili bir immun yanıt oluşumunu sağladığı gösterilmiştir (7). İki bin sekiz yılında yapılan bir çalışmada oral yolla alınan inaktif VHSV aşısı geliştirilmiş ve bu aşıyla aşılanan balıklarda yüksek miktarda MHC II ve CD4 gen ekspresyonu tespit edilmiştir. Bu yolla aşılanan balıklarda patojenite denemesinin ardından kontrol grubuna göre %75 daha az mortalite gözlenmiştir (3). Viral hemorajik septisemi virüsü G geni ve interlökin 8 geni taşıyan plazmidlerle yapılan aşılama çalışmalarında özellikle interlökin-1 β (IL-1 β), tümör nekrozis faktör α 1 (TNF- α 1) ve bunlar aracılığıyla da sitokin immun cevabını güçlendirdiği gösterilmiştir (38). Bütün bu çalışmalara rağmen henüz ticari olarak satılan VHSV aşısı bulunmamaktadır (9).

Yapılan bir çalışmada viral G proteinini (VHSV) açıklayan plazmidle aşılamanın ardından sekiz gün sonra hem VHSV hemde IHNV'ye karşı heterolog bir koruyuculuk gelişirken bakteriyel patojenlere karşı herhangi bir koruyuculuk gözlenmemiştir. Aradan 70 gün geçtikten sonra bağışıklık homolog antijene karşı olmaktadır. Bu bulgular kısa süreli, antiviral ve non-spesifik bir immun sistemin mevcudiyetine işaret etmektedir (19, 46, 59).

Viral hemorajik septisemi ve IHNV G proteiniyle yapılan aşılama balıklarda sadece antikor üretimini değil aynı zamanda enjeksiyon dokusunda interferon ve Mx geni salınımını da sağlamaktadır. Aşılamanın ardından birinci haftadan itibaren enjeksiyon dokusunda oluşan non-spesifik antiviral yanıtı

takiben 4-6 haftadan itibaren spesifik bir immün yanıt gözlenmektedir (1, 19, 75). Alabalıklarda Mx gen ekspresyonu çalışılmış ve VHSV G geni DNA aşısıyla kas içi aşılanan balıklarda 7. günden itibaren Mx gen ekspresyonu tespit edilmiştir. Mx geni ekspresyonu 14. günde pik seviyesine ulaşırken 21. günden itibaren sabit bir seviyede kaldığı gözlenmiştir (19, 47, 75).

Aquabirnavirusla enfekte edilen Japon dil balıklarında Mx proteini ekspresyonunda yükseliş ve tip 1 interferonların arttığı gözlenmiştir. Bu durum sekonder VHSV enfeksiyonuna karşı non-spesifik bağışıklık kazandıklarını göstermektedir (19, 57, 75). İlave olarak VHSV glikoproteiniyle hazırlanmış aşıyla intramuskuler olarak aşılanan gökkuşığı alabalıklarında, aşılamadan bir hafta sonra karaciğer dokusunda Mx geni ekspresyonu tespit edilmiştir. Benzer sonuç gökkuşığı alabalıklarının IHN, SHR ve SVC virüslerinin G proteinleriyle yapılan aşılama sonrası da gözlenmiştir. Bütün aşılama balıkta erken non-spesifik cevap oluşturmuş ve IHNV ile letal deneme enfeksiyonunda da yüksek seviyedeki Mx proteinine böbrek ve karaciğerde rastlanmıştır (1, 66).

İnsan α -defensin-1 peptidinin VHSV'ye karşı viral partiküllerin inaktivasyonu ve tip-1 interferon-ilişkili yanıtı teşvik edici etkisinin olduğu gösterilmiştir (26). Bununla beraber henüz hiçbir balık türünde α -defensinler tespit edilememiştir (25). Gökkuşığı alabalıklarında tip1 interferon (IFN) – ilişkili mekanizmayla ilgili olduğu tahmin edilen β -defensin benzeri peptid dizisi tespit edilmiş ve bu peptidin VHSV'ye karşı antiviral mekanizma üzerine etkisi gösterilmiştir (25). Gökkuşığı alabalıklarında VHSV enfeksiyonunun ardından CD8 α ve NKEF (natural killer enhancing factor) ekspresyonlarının arttığı, buna bağlı olarak sitotoksik T lenfositleri (CTL) ve doğal öldürücü (NK) hücrelerinin

varlığı ve böylelikle antiviral hücre bağımlı sitotoksiste (cell mediated cytotoxicity-CMC) geliştiği ortaya konulmuştur (75).

3.8. Koruma ve Kontrol

Danimarka'da, 1965 yılında uygulanmaya başlanan VHSV eradikasyon programı sonucunda 1997 yılına gelindiğinde enfekte işletme sayısı 400'den 26'ya düşürülmüştür (56). Uygulanan eradikasyon programı başlıca kuru bekletme, dezenfeksiyon ve yeniden stoklandırma çalışmaları olmak üzere üç konunun işletme sahiplerinin işbirliği ile uygulanması sonucunda gerçekleştirilmiştir.

Danimarka'da uygulanan eradikasyon programının benzerleri 1965'den 1974'e kadar beş işletmede Norveç'te, 1967-1972 yılları arasında iki işletmede İsveç'te, 1995-1997 yılları arası bir kalkan balığı işletmesinde İngiltere'de ve VHSV salgını çıkan işletmelerde İtalya, Fransa, Almanya ve İsviçre'de de benzer şekilde eradikasyon programları uygulanmıştır (56).

Uygulanan bu eradikasyon programlarında su sıcaklıklarının 10°C'nin üzerinde olduğu dönemde tüm balık varlığı ve malzemeler uzaklaştırılarak işletmeye gelen tüm su kesilmek suretiyle dört hafta süreyle kuruda bekletilmiştir.

Hastalığın eradikasyon çalışmalarına ilaveten bir aşılama programı da düşünülebilecek yollardan biridir. DNA temelli aşılama oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır. Bununla birlikte OIE tarafından yayınlanan ve Avrupa Birliği ülkelerinin yürürlüğe koydukları "Aquatic Animal Cod" mevzuatı gereği, aşılama VHSV'den ari bölgelerde uygulanmamaktadır (23, 56).

Tablo 2. Çeşitli dezenfektanların VHSV üzerine virüsidal etkileri (43).

Dezenfektan	En düşük etkili doz	En düşük etkili süre
Etanol	%40	2 dakika
1-propanol	%20	2 dakika
Fenol	%2,5	5 dakika
Kresol	%0,25	15 dakika
Sodyum hipoklorit	100 ppm	5 dakika
Sönmemiş kireç	50 ppm	60 dakika
İodin	50 ppm	1 dakika
Benzalkonyum Klorür	1/1000 dilüsyon	5 dakika

Gökkuşığı alabalıklarında gerçekleştirilen bir ıslah çalışmasında kızıl ağız hastalığı (yersiniosis), gökkuşığı alabalığı yavru sendromu (rainbow trout fry syndrom) ve VHSV'ye dirençli soylar araştırılmış, her üç hastalık içinde farklı soyların farklı dirençte oldukları ortaya konmuştur. Kızıl ağız ile gökkuşığı alabalığı yavru sendromuna dirençli soylar arasında bir korelasyon bulunmasına karşın VHSV'ye dirençli soylarla diğerleri arasında ters orantı ilişkisi bulunmuştur (31, 32). Bununla beraber VHSV enfeksiyonuna dirençli soylar elde edilerek gerçekleştirilebilecek ıslah çalışmalarının hastalığın kontrolünde önemli olabileceği vurgulanmıştır (31, 32).

Yapılan bazı çalışmalar balıklarda viral hastalıklara karşı doğal direnç bakımından bireysel farklılıklar olduğunu göstermektedir. Genetik ıslah çalışmalarıyla özellikle viral hastalıklara dirençli soyların yetiştirilmesinin, hastalıkla mücadele açısından önemli olduğu vurgulanmaktadır (32, 58, 65).

Amantadin ve Klorokin'in VHSV'nin hücresele reseptöre bağlanması üzerine herhangi bir etkisi olmazken Tributilamin'in 30 dk'lık uygulamanın ardından hücresele reseptöre bağlanmayı azalttığı bildirilmektedir (33).

Zeytin yaprağı ekstraktı ve bunun önemli bir bileşeni olan oleuropein maddesinin EPC hücre hattında yapılan invitro denemelerde viral enfektiviteyi % 10-30 seviyelerine düşürdükleri belirlenmiştir (49). Yine benzer şekilde yapılan bir çalışmada deniz mikroalglerinden *Phaeodactylum cruentum*, *Chlorella autotrophica* ve *Ellipsoidon sp.*, ekstraktlarının viral replikasyon üzerinde belirgin bir inhibisyon yaptığı ortaya konmuştur (24).

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Örnekler

Örnekleme takvimi belirlenirken balıkların üreme ve sıcaklık değişimi gibi stres faktörlerinin olduğu dönemler dikkate alındı. Bu nedenle, örnekler ilkbahar dönemi ile akut VHSV enfeksiyonlarının daha sık görüldüğü su sıcaklıklarının 15 °C'nin altına düştüğü geç sonbahar dönemlerinde toplandı. Bu amaçlarla hem deniz balıkları hemde tatlı su balık örnekleri dört dönem boyunca (2007-sonbahar, 2008-ilkbahar, 2008-sonbahar ve 2009-ilkbahar) örnekleme yapıldı.

Deniz balıkları için yapılan örnekleme için balıkçıların karaya çıkış noktalarının bulunduğu ve deniz balıkçılığı açısından nispeten daha önemli olduğu varsayılan başlıca sekiz ayrı merkez (doğudan batıya doğru; Hopa, Pazar, Trabzon, Ordu, Samsun, Sinop, İnebolu ve Ereğli) seçildi (Şekil 5). Deniz balıkları için belirlenen sekiz bölgeden, 12 farklı tür olmak üzere (palamut, hamsi, mezgit, barbunya, çipura, levrek, trakunya, istavrit, vatoz, izmarit, minakop ve kalkan balığı) toplam 3378 adet deniz balığı örneklendi (Tablo 3).

Tatlı su balıkları (gökkuşuğu alabalığı, *Oncorhynchus mykiss* ve Karadeniz dere alası, *Salmo trutta labrax*) için ise belirlenen dönemler boyunca 62 işletmeden 1089 adet porsiyonluk ve yaklaşık 1500 adet juvenil dönemdeki balık olmak üzere yaklaşık 2589 adet balık örneklendi (Tablo 4).

Tatlı su kaynaklı işletmelerden gerçekleştirilen örnekleme noktaları olarak, birbirinden bağımsız tatlı su kaynaklarının her birinden en az 30 adet olmak üzere, Türkiye-Gürcistan sınırı ile Sakarya nehri arasındaki bölgede kalan 62 işletme seçildi (Şekil 5, Tablo 5).



Şekil 5. Örnekleme noktalarının harita üzerinde gösterimi.

Sahadaki çalışmalarda toplanan örnekler laboratuara ulaştırılıncaya kadar araçtaki seyyar buzdolabında tutuldu ve laboratuara ulaştıktan sonra kullanılıncaya kadar -80°C 'de (UF-314, Heto-Holten AS, Gydevang, Danimarka) saklandı. Derin dondurucuda bekletilen örnekler çalışılacağı zaman çıkarılıp homojenizatör (Lab-GEN 7B, ColeParmer Instrument Company, Illinois, ABD) yardımıyla homojenize edilerek her bir örnek üç ayrı tüpe (1,5 ml'lik mikro santrifüj tüpü (Grainer-Bio-one GmbH, Frickenhausen, Almanya) dağıtıldı. Tüplerden biri hücre kültürüne inokulasyon için, ikincisi RT-PZR analizi için, diğeri ise kontrol olarak -80°C 'lik derin dondurucuya bırakıldı.

Tablo 3. Tarama çalışması süresince belirtilen bölgelerden yakalanan deniz balığı türlerinden alınan örnekler.

Tür	Hopa	Pazar	Trabzon	Giresun	Ordu	Samsun	Sinop	İnebolu	Ereğli	Toplam
Palamut (<i>Sarda sarda</i>)	-	-	37	10	-	-	-	-	-	47
Hamsi (<i>Engraulis encrasicolus</i>)	112	143	350	55	-	89	34	75	47	905
Çipura (<i>Sparus aurata</i>)	-	-	-	-	27	-	-	-	-	27
Levrek (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	-	-	-	-	36	-	-	-	-	36
İzmarit (<i>Spicara smaris</i>)	-	201	160	20	-	17	-	-	-	398
İstavrit (<i>Trachurus trachurus</i>)	-	110	260	34	30	37	76	30	25	602
Barbun (<i>Mullus barbatus barbatus</i>)	-	165	70	32	65	43	59	33	25	492
Mezgit (<i>Merlangius merlangus</i>)	95	90	182	78	23	74	105	28	39	714
Vatoz (<i>Raja clavata</i>)	-	-	58	-	-	-	-	-	-	58
Trakonya (<i>Trachinus draco</i>)	-	-	65	-	-	-	-	-	-	65
Minekop (<i>Umbrina cirrosa</i>)	-	-	10	-	-	-	-	-	-	10
Kalkan (<i>Psetta maxima</i>)	-	-	24	-	-	-	-	-	-	24
Toplam	207	709	1216	229	181	260	274	166	136	3378

Tablo 4. Tarama çalışması süresince belirtilen bölgelerdeki alabalık işletmelerinden alınan örnekler.

	Artvin	Rize	Trabzon	Giresun	Ordu	Samsun	Sinop	Kastamonu	Bartın	Zonguldak	Düzce	Toplam
Porsiyonluk	96	168	117	237	193	50	15	82	34	31	66	1089
Juvenil	300	150	-	550	150	-	-	100	100	100	50	1500
Toplam	396	318	117	787	343	50	15	182	134	131	116	2589

Tablo 5. Tarama çalışması süresince örnek alınan alabalık işletmelerinin illere göre dağılımı.

	Artvin	Rize	Trabzon	Giresun	Ordu	Samsun	Sinop	Kastamonu	Bartın	Zonguldak	Düzce	Toplam
Porsiyonluk	6	11	8	14	7	2	1	5	2	2	4	62
Juvenil	6	3	-	11	3	-	-	2	2	2	1	30

4.2. Hücre Kültüründe Virüs İzolasyonu

4.2.1. Hücre Hatları ve Vasatları

Hücre üretme vasatı ve diğer solüsyonları hazır sıvı vasatlar olarak kullanıldı;

- Minimum Esansiyel Medium / Earle's Salts (MEM Earle; Biochrom AG, Berlin, Almanya)
- Fetal Bovine Serum (FBS; Biochrom AG, Berlin, Almanya)
- Trypsin/EDTA solüsyonu (Biochrom AG, Berlin, Almanya)
- Hanks' Salt Solution 1X (Biochrom AG, Berlin, Almanya)
- Antibiyotik-Antimikotik (10000 IU/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin, 0,025mg/ml amfoterisin B) (Biological Industries, İsrail)
- HEPES (4[2hydroxyethyl]piperazine ethane sulfonic acid) (Biochrom AG, Berlin, Almanya)

Virüs izolasyonu amacıyla Ankara ŞAP Enstitüsü' nden temin edilen BF-2/An1 (Bluegill fry) ve RTG-2/An1 (Rainbow trout gonads) balık hücre hatları kullanıldı.

4.2.2. Hücrelerin Ekim İçin Hazırlanması

Hücreler, 25 ve 75 cm² 'lik hücre üretme flasklarında (TPP AG, Trasadingen, İsviçre) %10 fetal bovine serum (FBS), %1 HEPES ve % 1 antibiyotik-antimikotik içeren MEM Earle vasatında monolayer hale getirildi. Daha sonra vasatları boşaltılarak tripsin/EDTA solüsyonu ile 3-5 dakika oda sıcaklığında maruz bırakılıp ardından tripsin/EDTA solüsyonu boşaltılarak taze

MEM Earle vasatı ile hücreler birbirlerinden ayrılıncaya kadar pipete edildi. Bir günde %80 hücre yoğunluğuna ulaşacak şekilde yeteri kadar vasat ve %10 FBS ilave edildikten sonra 24 kuyucuklu hücre üretme pleytlerine pasajlandı. Hücrelerin vasatı 24 saat sonra %2 FBS, %1 HEPES ve %1 antibiyotik-antimikotik ilaveli MEM Earle vasatıyla değiştirilerek virüs ekimine hazır hale getirildi.

4.2.3. Hücre Kültürüne İnokulasyon

Hücre kültüründe virüs izolasyonu için hazırlanan doku homojenatı 1/10 oranında hücre üretme vasatı ile sulandırılıp 0,45µm enjektör filtreden (Sartorius AG, Goettingen, Almanya) geçirildi. Daha sonra 100 µl süzüntü daha önceden hazırlanmış olan ve % 2 FBS ilaveli MEM vasatında çoğaltılan, % 80 monolayer olmuş 24 kuyucuklu pleytteki (Grainer-Bio-one GmbH, Frickenhausen, Almanya) BF-2 ve/veya RTG-2 hücrelerine ekildi. Ekimde her örnek için iki kuyucuk kullanıldı.

Hücreler CPE gözleninceye kadar 15°C'de 2 hafta boyunca inkübatörde (MIR-153, Sanyo, Japonya) inkübe edildi ve her iki günde bir CPE varlığı yönünden invert mikroskop (CK30, Olympus Opt. Co., Japonya) kullanılarak kontrol edildi. İki haftalık inkübasyon sonunda CPE gözlenmeyen örnekler yeniden 24 kuyucuklu pleytte hazırlanan hücre hattına 100 µl inokule edilerek subkültürü yapıldı. Bir hafta daha 15°C'de inkübasyona bırakıldı. Subkültür işleminin ardından CPE göstermeyen örnekler negatif olarak değerlendirildi ve muayene sonuç formuna kaydedildi.

4.3. Virüsler

Çalışmada kullanılan virüslerden iki tanesi 2005 yılında Trabzon ili açıklarından yakalanan ve Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü (TSÜMAE) yetiştirme ünitesinden alınan kalkan balıklarından izole edilen TR-WS13G ve TR-B13/15H izolatlarıdır. Bir diğer izolat ise 2006 yılında Bolu ili Mudurnu ilçesindeki bir alabalık işletmesindeki alabalıklardan izole edilen TR-BOLU izolatıdır. Bu izolat ise Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü (BVKAE), viroloji laboratuvarından sağlandı.

TR-WS13G, TR-Bs13/15H ve TR-BOLU izolatlarının dışındaki tüm izolatlar yürütülen tarama çalışmasının ardından izole edilen izolatlardır.

4.4. Virüs Titrasyon Testi

Virüslerin titrasyonu için bir gün önce 96 kuyucuklu pleytte hazırlanmış BF-2 hücreleri kullanıldı. Bu amaçla her virüsün daha önceden -80°C'de saklanan viallerinden birisi açılarak vortekslenip 100 µl alındı. Alınan virüsün (%1 HEPES ilaveli MEM Earle vasatı) kullanılmak suretiyle 10⁻¹'den 10⁻¹⁰'a kadar 10 tabanlı seri sulandırmaları hazırlandı. Hazırlanan virüs sulandırmalarının her sulandırması dört göze olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre pleytine 100 µl ilave edildi. Virüs ekimi gerçekleştirilen hücreler 15°C'deki inkübatörde inkübasyona bırakılarak CPE yönünden günlük kontrolleri yapıldı. CPE gözlemlendikten sonra sonuçlar kaydedilerek Spermann-Köerber metoduyla DKID₅₀ (doku kültürü enfektif doz 50) hesaplandı (74).

4.5. Virüs Nötralizasyon Testi

Kantitatif virüs nötralizasyon testi uygulanmıştır. Testte nötralizan antiserum olarak VHSV ve IPNV antiserumu (Bio-X Diagnostics, Jemelle, Belçika) pozitif ve negatif nötralizasyon için kullanıldı. Öncelikle virüsün 10 tabanlı seri dilüsyonları hazırlandı. Hazırlanan dilüsyonlar eşit miktardaki Hanks tamponlu tuzlu çözeltisiyle 1/50 oranında dilüe edilmiş antiserumla karıştırılarak 18°C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her dilüsyondan 4 kuyucuğa olmak üzere 100 µl/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu BF-2 hücresine inokule edildi. Hazırlanan pleyt 18°C’de 7-10 gün boyunca CPE yönünden takip edilmiş ve bu sürenin sonunda sonuçlar kaydedildi (74).

4.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

4.6.1. Viral RNA Ekstraksiyonu

Viral RNA ekstraksiyonunda Trizol Reagent (Invitrogen, Paisley, İskoçya) kiti kullanıldı. Ekstraksiyonu yapılacak doku pirinç büyüklüğünde alınarak %1 Diethylpyrocarbonate (DEPC) ilaveli sulandırma solüsyonu ile birlikte homojenize edilerek 500 µl toplam hacime ulaştırıldı. Hücre süpernatantından PZR yapılacağı zaman doğrudan doğruya 500 µl süpernatant alınarak ekstraksiyona geçildi. Homojenata/süpernatanta 500 µl Trizol ilave edilip vortekslenerek (VortexGene2, Scientific Industries, Newyork, ABD) 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Üzerine 100 µl kloroform ilave edilip, örnekler 4°C’de, 13500 rpm 15 dk. santrifüj (3K15, Sigma, Almanya) edildi. Üstteki saydam tabaka dikkatlice yeni bir tüpe alınarak üzerine eşit miktarda isopropil alkol ilave edilip, vortekslenerek oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edildi. 4°C’de, 13500 rpm -

15 dk. santrifüj edilip dikkatlice sıvı kısım dökülmüş, üzerine 800 µl %70 'lik etil alkol ilave edilerek tekrar vortekslenip 4°C'de, 13500 rpm'de - 15 dk. santrifüj edildi. Sıvı kısım dikkatlice boşaltılıp tüp ters çevrilerek pelet 5-10 dk. kurumaya bırakılıp ve son olarak peletin üzerine 25-50 µl diethylpyrocarbonate (DEPC)'li su ilave edildikten sonra RT-PZR aşamasına geçildi.

4.6.2. Tersine Transkripsiyon - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Tersine Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) amplifikasyonunda iki farklı primer seti kullanıldı. Bunlardan ilki VHSV G geninin 587 bazlık korunmuş bir bölgesini hedef alan VGF ve VGR dejenere primer seti (55) ve diğer ikincisi ise nükleoprotein geninin 811 bazlık bir bölgesini hedef alan primerlerdir (Tablo 6) (8, 55).

RT-PZR aşamasında, ekstrakte RNA 95°C'de 5 dk. denatüre edildikten sonra 10µl PZR Buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8,3], 50 mM KCl), 50 U Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase (Promega, Madison, Wisconsin, ABD), 2,5 µM revers primer, 1 mM dNTP ve 5 mM MgCl₂ içerisinde PZR cihazında bir döngü 95°C'de 5 dk., 42°C 'de 30 dk. ve ardından 99°C'de 10 dk tutularak reaksiyon durduruldu. Daha sonra tüpe 40µl PZR karışımı (0,5 µM her bir primer, 1,25 U Taq DNA polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, ABD), 0,2mM dNTP mix, ve 2mM MgCl₂) ilave edilerek PZR aşamasına geçildi. Bu aşamada PZR termal cihazı (Astec PC-800, Tokyo, Japonya), 95°C'de 2 dakikalık bir ön denaturasyondan sonra 30 döngü olarak sırasıyla 95°C'de 40 sn.,

60°C'de 40 sn., 72°C'de 40 sn ve son olarak bir defa 72°C'de 5 dk. olarak programlandı (55).

Tablo 6. RT-PZR amplifikasyonunda kullanılan primerler.

Adı	Dizilimi	Gen	Boyut	Kaynak
Vg-F	5'-CCAGCTCAACTCAGGTGTCC-3'	Glikoprotein	587 bç	55
Vg-R	5'-GTCACYGTGCATGCCATTGT-3'			
Oie-F	5'-GGGGACCCCAGACTGT-3'	Nükleoprotein	811 bç	9
Oie-R	5'-TCTCTGTCACCTTGATCC-3'			

4.6.3. RT-PZR Ürünlerinin Jel Elektrofrezinde Gösterilmesi

Elektrofrez için TAE buffer (40 mM Tris-acetate [pH 8,0], 1 mM EDTA) kullanıldı. Aynı buffer içerisinde %2'lik olarak agaroz jel (Sigma, Steinheim, Almanya) hazırlandı. Elde edilen RT-PZR ürünlerinden 9 µl alınıp 1,5 µl 6X Loading Dye (Promega, Madison, Wisconsin, ABD) ile karıştırıldıktan sonra kuyucuklara yüklenip elektrofrez cihazında (Mupid2Plus, Takara Mirus Bio, Madison, Wisconsin, ABD) 50 volt elektrik akımına maruz bırakıldı. Ürünün 25-35 dk. jel boyunca ilerlemesinin ardından etidyum bromid (Sigma, Steinheim, Almanya) banyosunda 15-20 dk. bekletildi. Ardından jel görüntüleme sisteminde (DH-30/32, BMG Labtech GmbH, Offenburg, Almanya) UV ışığı altında görüntülendi.

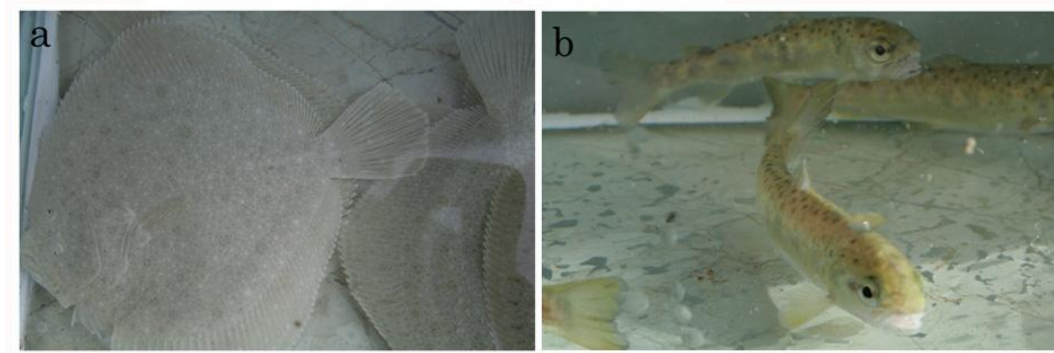
4.7. Kısmi Gen Dizileme Analizi

Glikoprotein geninin kısmi gen dizilemesi VHSV G geninin 587 bazlık korunmuş bir bölgesini hedef alan VgF ve VgR primerleri kullanılarak Makrogen Inc. laboratuvarlarında (World Meridian Venture Center 10F, 60-24, Gasan-dong, Geumcheon-gu, Seoul, Korea) çift yönlü olarak diziletildi.

4.8. Deneysel Enfeksiyon

4.8.1. Balıklar

Enfeksiyon denemelerinde kullanılacak olan kalkan “*Psetta maxima*” ve Karadeniz dere alabalığı “*Salmo trutta labrax*” TSÜMAE kuluçkahanelerinden temin edilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Deneysel enfeksiyon için kullanılan balıklar (a: kalkan, *Psetta maxima*; b: Karadeniz dere alabalığı, *Salmo trutta labrax*).

Deneysel enfeksiyon için kullanılacak kalkan balıkları 10-13 cm boy (~ 11,9 cm) ve 18-23 g ağırlığa erişmiş (~20,4 g), 6 aylık yaşta, 2009 yılı yavrularından 1000 adet balık rastgele seçildi ve her tanka 20 adet olacak şekilde dağıtıldı.

Alabalıklar ise yine 2009 yılı üretimi olan, parmakboy diye tabir edilen 7-10 cm (~9,3 cm) boy ve 7-10 g (~8,3 g) ağırlığındaki balıklardan 1000 adet

rastgele seçildi ve her tanka 30 adet olacak şekilde dağıtıldı. Adaptasyonda yaşanan sıkıntılar sebebiyle alabalıkların tankları birleştirilerek tekerrürleri kaldırıldı. Tüm adaptasyon süresi boyunca (yaklaşık 20 gün) 2000'den fazla alabalık kullanıldı. Adaptasyon sürecinin sonunda hayatta kalan 900 adet balık birleştirilmiş olan tanklara 50'şer adet olarak dağıtıldı.

4.8.2. Enfeksiyon Denemeleri İçin Virüslerin Hazırlanması

Enfeksiyon denemesinde kullanılacak virüsler 75 cm²'lik flaskta monolayer olan BF-2 hücre hattında iki pasaj yapılarak titresi ve miktarı artırıldı. İkinci pasajdan sonra hücre süpernatantı 0,45 µm por çapındaki enjektör filtreden süzülme suretiyle viallere alınıp titresi ölçüldükten sonra kullanılmaya kadar -80°C'de saklandı.

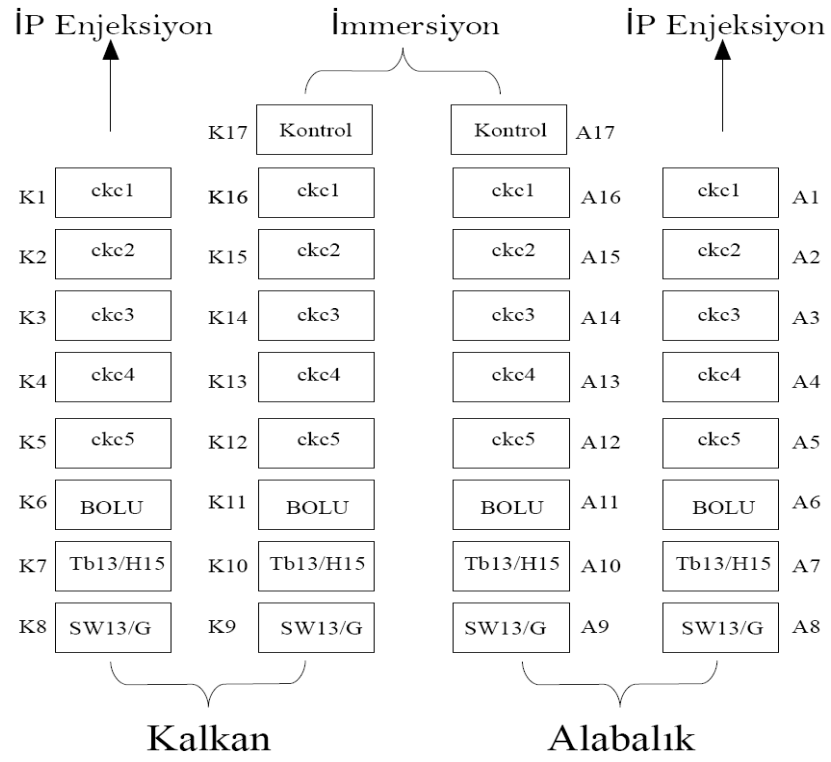
Enjeksiyon yoluyla yapılan enfeksiyon denemesinde her balığa 100 virion, immersiyon yoluyla yapılan uygulamada ise hazundaki suyun her ml'sine 10000 virion olacak şekilde enfeksiyonlar gerçekleştirildi (74).

4.8.3. Deneme Tanklarının Hazırlanması ve Deney Tasarımı

DeneySEL enfeksiyonların gerçekleştirebileceği, nispeten üretim birimlerinden daha izole bir ortam belirlenerek 32 adet 200 lt'lik deneme tankı yaklaşık 30 ton kapasiteli bir beton havuzun üzerine yapılan iskeleyle yerleştirildi. Burada çıkış suyunun, altta bulunan beton havuzda toplanarak denizin kontaminasyonunu engellemek amacıyla, enfekte suyun dezenfekte edilerek denize gönderilmesi amaçlandı. Beton havuzun boşaltımı günlük olarak saat 09⁰⁰

ve 16⁰⁰ sularında olmak üzere iki defa gerçekleştirildi. Her boşaltımdan sonra tanka 5 kg kireç uygulaması tekrarlandı.

Deneyde kullanılacak bütün balıklar deney şartlarında 20 gün adaptasyona alınmıştır. Adaptasyon döneminde kalkan balıklarında hiç ölüm olmazken alabalıkların yarısından fazlası bu aşamada öldü. Bu amaçla 1000 adet kalkan balığı ile deniz suyunda adaptasyona alınan smoltifikasyon (salmon türü balıklarda balığın kendine has gümüşü rengi aldığı ve bazı fizyolojik değişimler geçirdiği, tatlı sulardan denize geçiş öncesi balıkların geçirdikleri gelişim süreci) boyundaki yaklaşık 2000 adet karadeniz dere alabalığından hayatta kalan 900 adet balık kullanıldı. Bu durum tekerrür sayısının azaltılmasını zorunlu kıldığından alabalıklar tekerrürsüz çalışıldı. Her tanka 50'şer adet alabalık olmak üzere 850 balık kullanılarak 17 adet deneme tankı (A1-A17) hazırlandı. Kalkan balıkları içinse her bölmeye 20 adet olacak şekilde, deneme tankları alüminyum plakalarla üç eşit parçaya bölünmek suretiyle 16 adet deneme tankı (K1-K16) hazırlandı. Bir adet deneme tankı ise (K-17) iki bölmeye ayrılarak 50 adet alabalık ile 40 adet kalkan balığı konuldu (Şekil 7, 8) (12, 18, 77).



Şekil 7. Deneme ünitesinin şematik olarak gösterimi.



Şekil 8. Deneme ünitesinin fotografik görünümü.

4.9. Filogenetik Analiz

Sekans sonuçları gelen virüsler, “ClustalW” programı yardımıyla çoklu hizalama yapıldı (multiple alignment) ve “Mega 4” programı kullanılarak filogenetik ağacı şekillendirildi (61, 71, 72).

5. BULGULAR

5.1. Hücre Kültüründe Virüs İzolasyonu

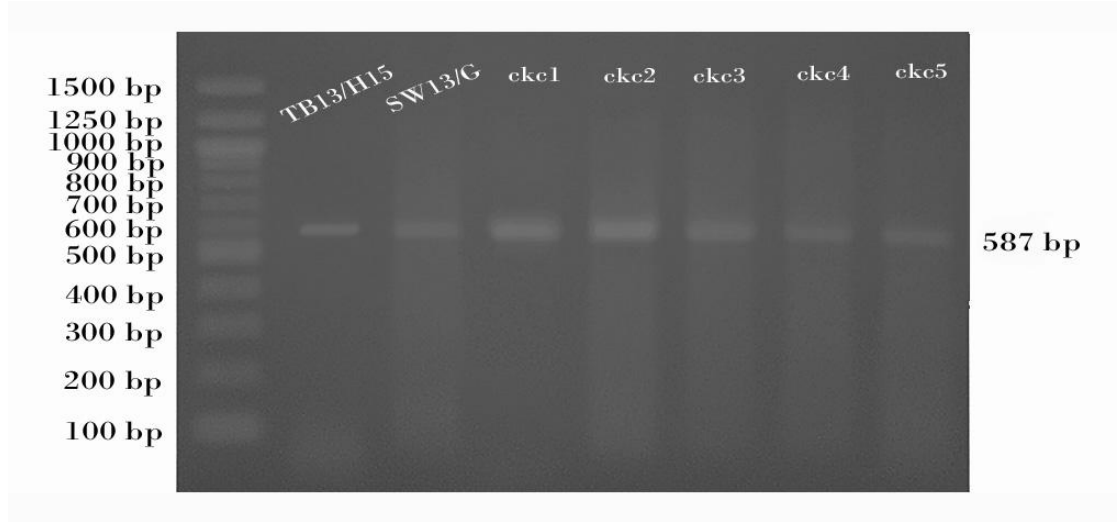
Hücre kültüründe yapılan virüs inokulasyonunun ardından toplam dört işletmeye ait gökkuşağı alabalıklarından alınan örneklerle altı adet kalkan balığından alınan örneklerde CPE gözlemlendi. Bu örnekler mikro santrifüj tüplerine alınarak 4°C'de, 12000 rpm'de, 15 dk santrifüj edildikten sonra 0,45 µm por çapına sahip enjektör filtreden süzülerek dondurma viallerine (Grainer-Bio-one GmbH, Frickenhausen, Almanya) alınıp -80°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı.

5.2. RT-PZR Amplifikasyonu

Tüm örnekler VgF ve VgR dejenere primer seti (55) ile OieF ve OieR (9) kullanılarak çalışıldı ve doğrudan dokudan yapılan amplifikasyonda sadece üç adet kalkan balığından çok zayıf bant gözlemlendi. Bununla beraber hücre süpernatantlarından yapılan RT-PZR çalışmalarında, 10 adet CPE göstermiş örneğin beş tanesi 587 bp uzunluğundaki bantı vermiştir (Şekil 9). Bu örneklerin tamamı kalkan balıklarından alınan örneklerdir. Bu bantların biri (TRDckcK05) hem beyin hem böbrek dokusundan CPE oluşturan, bir adet kalkan balığının sadece böbrek dokusundan alınan örnekte gözlemlenebildi.

Bir adet kalkan balığında gözlenen bu durumun ardından balığın beyin dokusundan elde edilen CPE göstermiş hücre süpernatantı ülkemizde görülen ve görülme ihtimali olan IPNV ve IHNV yönünden analiz edildi. Yapılan virüs nötralizasyon testi ve PZR amplifikasyonu sonuçları balığın beyin dokusundaki virüsün IPNV olduğunu gösterdi.

Böylece ülkemizde ilk defa kalkan balıklarından IPNV izolasyonu yapıldı. Bunun yanında iki farklı balık virüsünün (IPNV ve VHSV) bir balıktan izolasyonu da ülkemizde ilk defa gösterildi.



Şekil 9. RT-PZR çalışması sonucunda elde edilen 587 bç uzunluğundaki bantların UV ışığı altındaki görünümü.

5.3. Virüs Nötralizasyon Testi

Hücre hattında CPE oluşturan örneklerden beş tanesi virüs nötralizasyon testi ile VHSV olarak doğrulandı. Altı adet örnek ise “serogrup sp” IPNV anti-serumu (BVKAE’den temin edildi) ile gerçekleştirilen negatif nötralizasyon testine pozitif sonuç vererek IPNV olarak teşhis edildi.

5.1. Virüsler

Çalışmalarda üç adet daha önceden izole edilen izolatin yanında beş adet yeni VHSV izolatu elde edildi (Tablo 7).

Tablo 7. Enfeksiyon denemesinde kullanılan ve tarama çalışmasında izole edilen VHSV İzolatları.

İzolat adı	İzole edildiği balık türü	İzolasyon yılı	Kaynak
TR-WS13G	Kalkan (doğal)	2005	Hakan IŞIDAN / SUMAE
TR-B13/15H	Kalkan (kültür)	2005	Hakan IŞIDAN / SUMAE
TR-BOLU	Gökkuşığı alabalığı (kültür)	2006	Dr. Gülnur KALAYCI / BVKAE
TRDckcK01	Kalkan (doğal)	2008	izolat
TRDckcK02	“	2008	“
TRDckcK03	“	2008	“
TRDckcK04	“	2009	“
TRDckcK05	“	2009	“

TR-WS13G ve TR-B13/15H izolatlarının her ikisinde 2005 yılında doğal ve kültüre alınmış kalkan balıklarından izole edilmiştir. TR-BOLU izolatu ise 2006 yılında Bolu ilinin Mudurnu ilçesinde bir alabalık işletmesinde görülen klinik hastalığın ardından izole edilmiştir. Bu izolat deneysel enfeksiyonda kullanılmak üzere BVKAE'den resmi yazıyla talep edilmiştir.

TRDckcK01, TRDckcK02, TRDckcK03, TRDckcK04, TRDckcK05 izolatları bu çalışmada doğada yaşayan kalkan balıklarından 2008 ve 2009 yıllarında izole edilmiş olan izolatlardır.

5.4. Deneysel Enfeksiyon

Otuz gün boyunca ortalama 12°C deniz suyu sıcaklığında sürdürülen enfeksiyon denemesinde TR-SW13/G izolatinin immersiyou yoluyla kalkan balıklarına uygulandığı bölmelere, denemenin yedinci gününde su borularındaki tıkanıklık nedeniyle temiz su gelemeyerek bu deneme gruplarındaki bir balık hariç

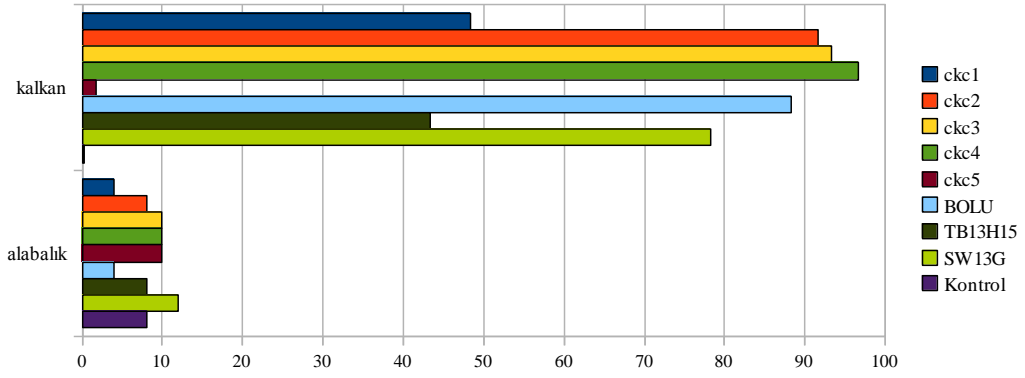
tamamının ölmesine yol açtı. Su kesintisinden sonra hayatta kalabilen bir adet balığın 30 günün sonunda ölmediği gözlemlendi.

Enfeksiyon denemelerinde balıkların günlük bakımları yapılırken İP enjeksiyon ve immersiyon yoluyla virüs uygulanan balıkların davranışları ve klinik görünüşleri dikkatlice gözlemlenmiştir. Buna göre özellikle immersiyon yoluyla uygulanan enfeksiyona yakalanan kalkan balıklarının bazı bireyleri anormal yüzme davranışı gösterdi. İP enjeksiyon yoluyla virüs verilen kalkanların % 60-65'inde asites olduğu gözlemlenirken, immersiyon yoluyla virüs verilen kalkanlarda % 10-15 oranında olduğu tespit edildi. Deney esnasında gözlemlenebilen bir diğer klinik bulgu ise özellikle baş, ağız, gözler ve solungaçlar etrafında göze çarpan ve şiddeti bakımından bireyler arası farklılıklar gösteren hemoraji olmuştur. Bazı balıklar tüm vücut kaslarına, yüzgeç lamelaları arasına kadar yayılmış çok şiddetli hemorajik tablo içerisine girmiş olmalarına rağmen diğerleri daha hafif yalnızca baş ve solungaçlar etrafındaki bölgede hemoraji bulgusu göstermişlerdir. Ölen balıkların önemli bir kısmı (% 30-35) ise belirgin bir belirti göstermeden ölmüştür. Gözlemlenebilen diğer bir klinik bulgu ise ekzoftalmustur. Ölen balıkların yaklaşık % 15-20'sinde gözlerin ekzoftalmik görünümde olduğu görülmüştür (Şekil 10).

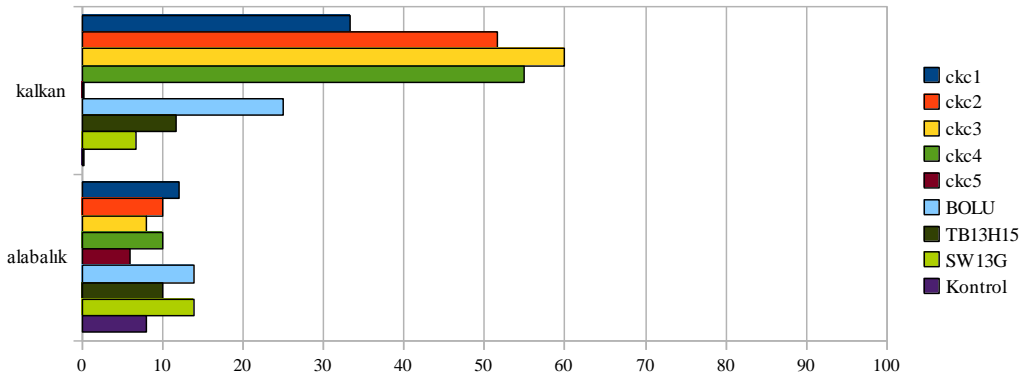
Enfeksiyon denemesi boyunca ölümler günlük olarak kaydedilerek ölen balıklara ait beyin ve kalp dokuları ayrı ayrı 2,5 ml'lik endendorf tüplerine alınarak VHSV varlığı yönünden RT-PZR ve hücre kültürüne ekim yapılmak suretiyle incelenmiştir. Kalkan ve Karadeniz dere alabalıklarında uygulanan enfeksiyon denemesinin sonuçları Şekil 11-16'da gösterilmiştir.



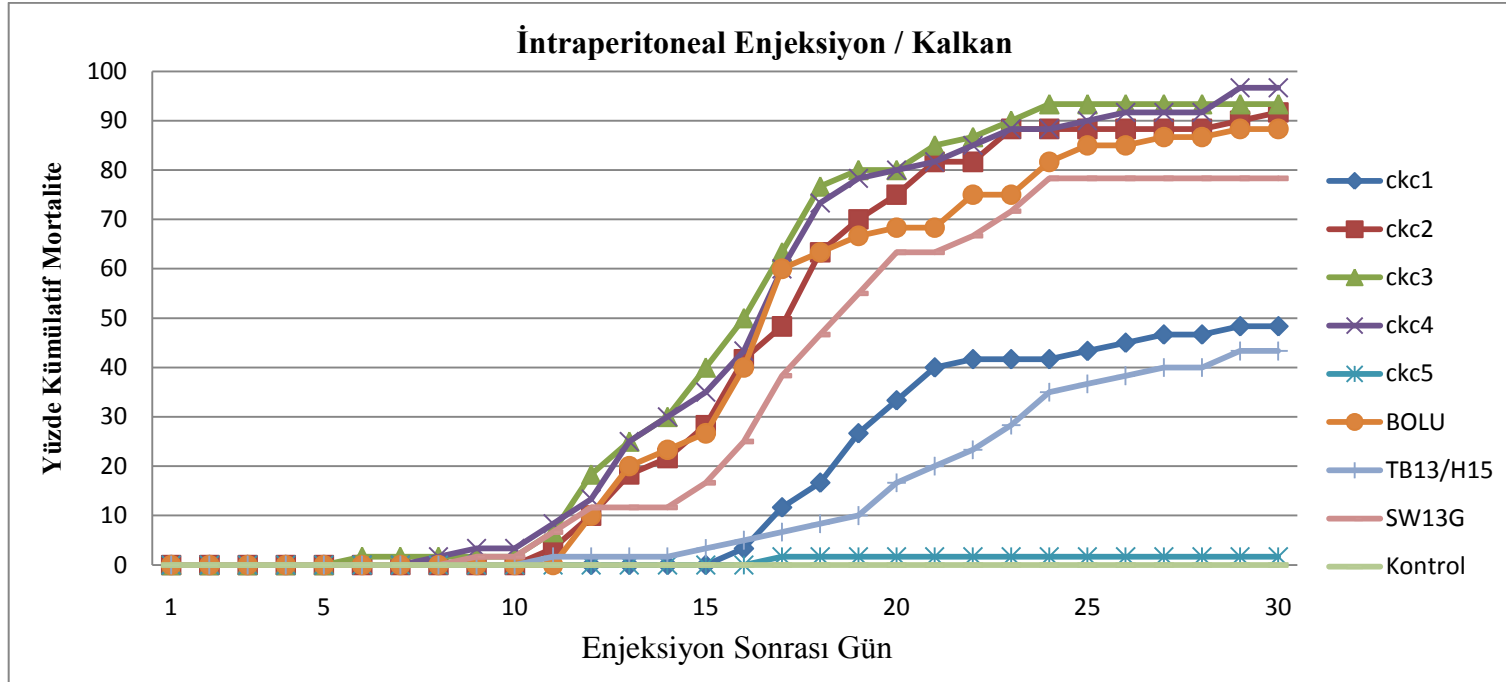
Şekil 10. Enfeksiyon denemelerinde kalkan balıklarında görülen klinik bulgular.



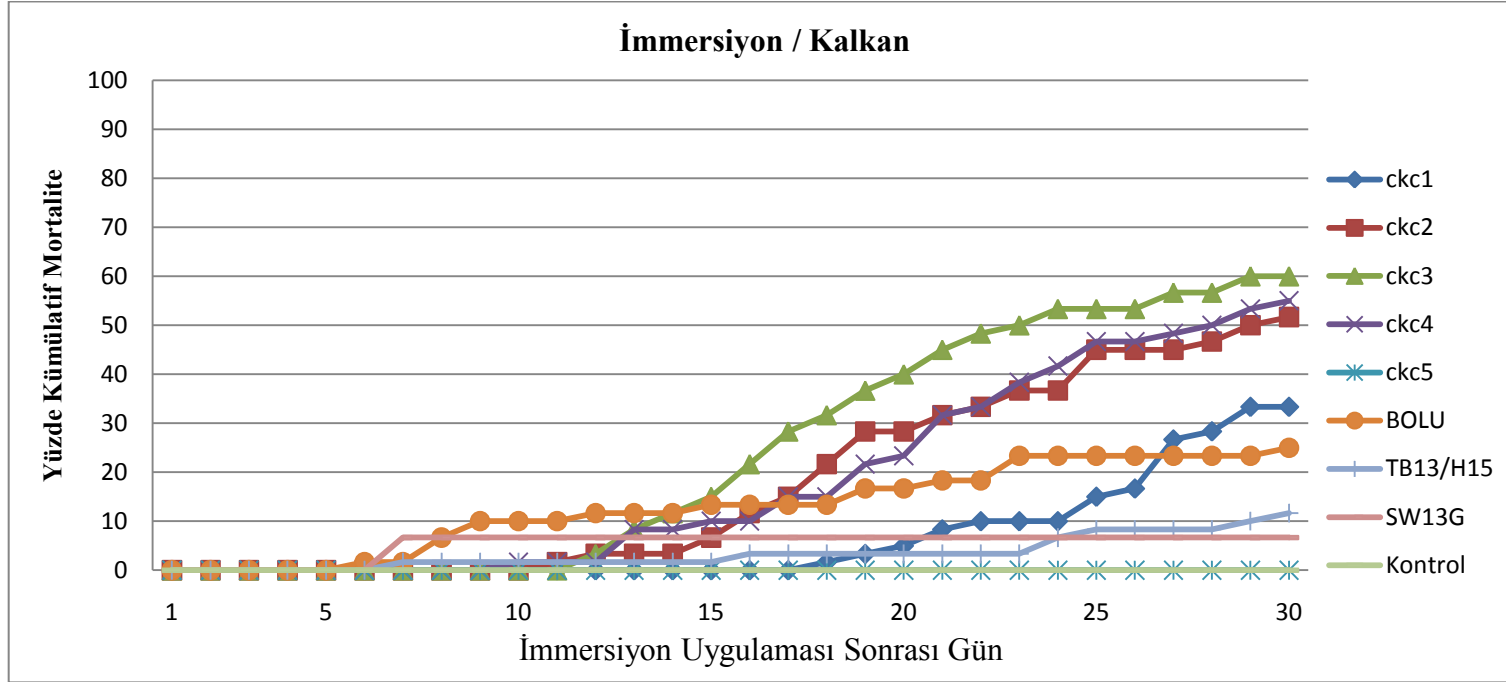
Şekil 11. İntraperitoneal enjeksiyon yoluyla yapılan enfeksiyon denemeleri sonucu meydana gelen ölüm oranları.



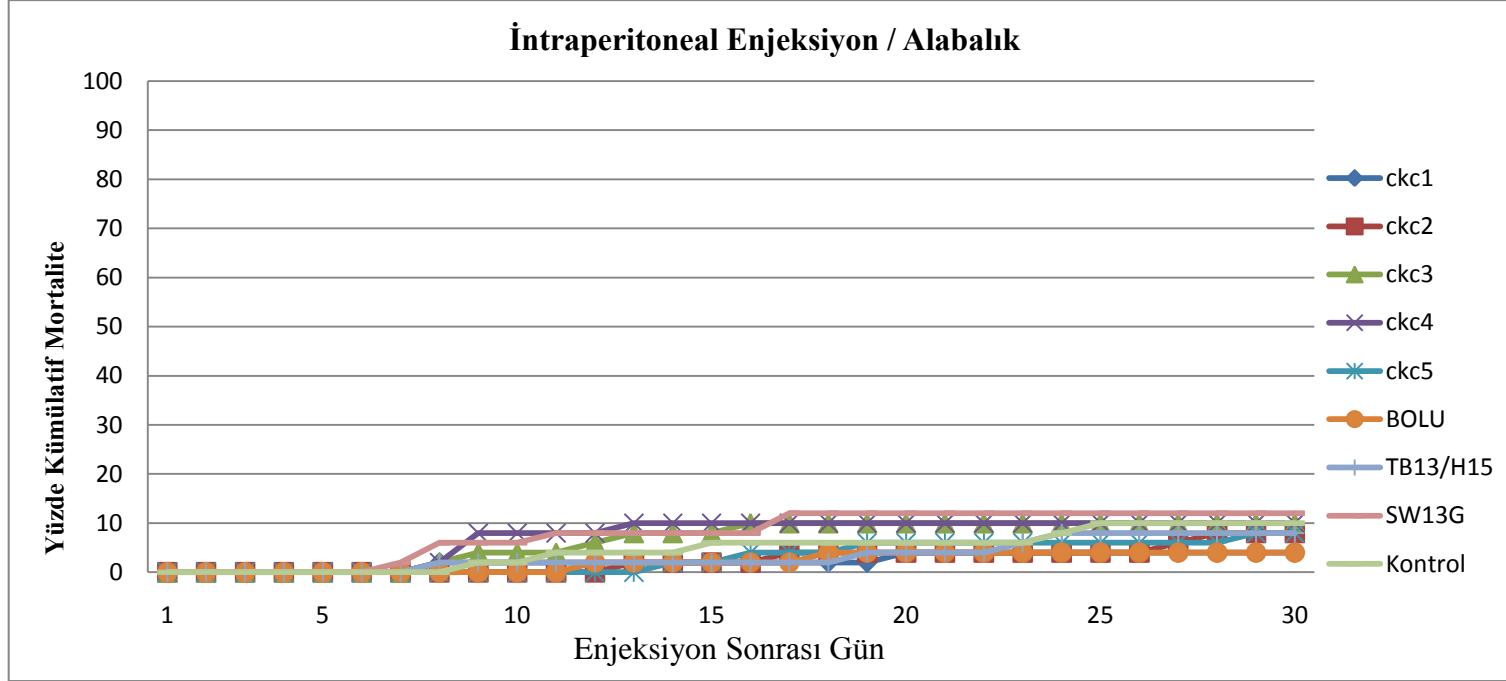
Şekil 12. İmmersiyon yoluyla yapılan enfeksiyon denemeleri sonucu meydana gelen ölüm oranları.



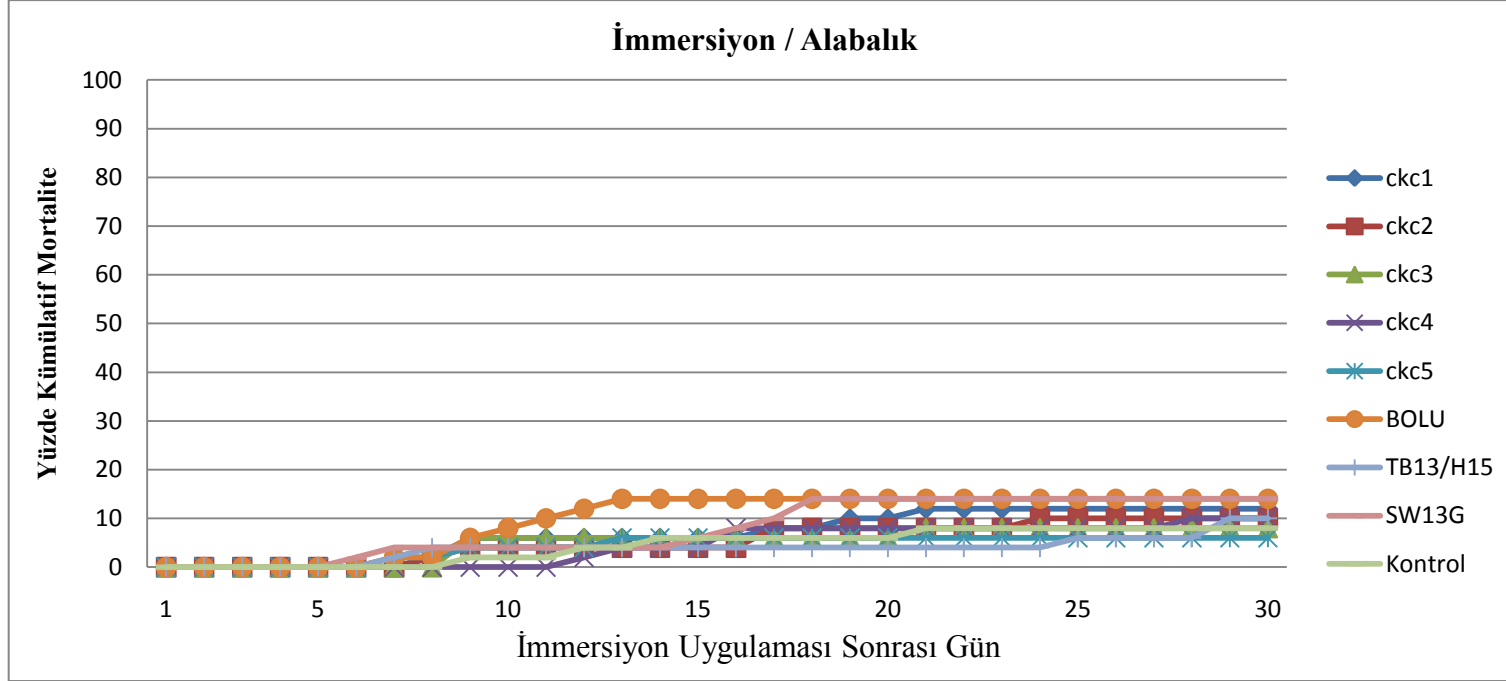
Şekil 13. Kalkan balıklarında (*Psetta maxima*) İP enjeksiyon yoluyla yapılan enfeksiyon denemesine ait yüzde kümülatif mortalite değerleri.



Şekil 14. Kalkan balıklarında (*Psetta maxima*) İM yoluyla yapılan enfeksiyon denemesine ait yüzde kümülatif mortalite değerleri.



Şekil 15. Karadeniz dere alabalığında (*Salmo trutta Labrax*) İP enjeksiyon yoluyla yapılan enfeksiyon denemesine ait yüzde kümülatif mortalite değerleri.



Şekil 16. Karadeniz dere alabalığında (*Salmo trutta Labrax*) İM yoluyla yapılan enfeksiyon denemesine ait yüzde kümülatif mortalite değerleri.

5.5. Filogenetik Analiz

ClustalW, BioEdit ve Mega4 genetik analiz programları kullanılarak hazırlanan çoklu hizalama işlemi yapılarak, virüslerin hem nükleotit dizilimi hemde aminoasit dizilimi kıyaslandı (35, 71).

Yapılan analizinin ardından filogenetik ağaçlar oluşturuldu. Filogenetik ağaçların oluşturulmasında Mega4 programından minimum evrim, maksimum parsimoni parametreleri kullanıldı ve konsensus ağaçları Neighbor-Joining metodu kullanılarak çizdirildi (61). Ağaçlar çizilirken evrimsel uzaklık Maximum Composite Likelihood metodu kullanılarak hesaplandı (72).

Tablo 8. Filogenetik analizlerde kullanılan izolatlar.

İzolat adı	Genbank	Tarih	İzole edildiği tür
UK-MLA98/6PT11	AY546632	1998	Norway pout
DK-4p101	AY546581	1997	Whiting
FR-L59X	AY546618	1987	Yılan balığı
UK-860/94	AY546628	1994	Kalkan
DK-1p53	AY546577	1996	Herring
DK-1p52	AY546576	1996	Sprat
FR-0771	AY546616	1971	Gökkuşığı alabalığı
DK-7380	AY546594	1994	Gökkuşığı alabalığı
DK-6p403	AY546584	1999	Herring
FI-ka422	AY546615	2000	Gökkuşığı alabalığı
NO-A16368G	AY546621	1968	Gökkuşığı alabalığı
DK-2835	AY546585	1982	Gökkuşığı alabalığı
BC98-250	DQ401187	-	Atlantic salmon
WA91Clearwater	DQ401189	-	Coho salmon
BC99-292	DQ401188	-	Atlantic salmon
BC93-372	DQ401186	-	Pacific herring
JP99Obama25	DQ401191	-	Japon dil balığı
ME03	DQ401192	-	Atlantic herring
BC99-001	DQ401195	-	Pacific sardine
BC99-010	DQ401194	-	Pacific herring
MI03GL	DQ427105	-	Muskellunge
JP96KRRV9601	DQ401190	-	Japon dil balığı
DK-F1	Z93408	-	Gökkuşığı alabalığı
DK-Hededam	Z93412.2	-	Gökkuşığı alabalığı
USMakah	U28747.1	-	Coho salmon
DK-M.rhabdo	AY356632.1	1979	Atlantic cod
DK-5131	AF345858.1	-	Gökkuşığı alabalığı
GE-1_2.	AY546619	1981	Gökkuşığı alabalığı
TR-SW13/G	AB231160	2005	Kalkan
TR-TBs13/H15	AB231161	2005	Kalkan
TR-BOLU		2006	Gökkuşığı alabalığı
TRDckcK01		2008	Kalkan
TRDckcK02		2008	Kalkan
TRDckcK03		2008	Kalkan
TRDckcK04		2009	Kalkan
TRDckcK05		2009	Kalkan

Tablo 9. BioEdit genetik analiz programı kullanılarak yapılan çoklu hizalama (multiple alignment) tablosu.

	3140	3150	3160	3170	3180	3190	3200	3210	3220	3230
Heddam			A				C			
GE-12			A					C		
TRBs13/H15										
TRSW13/G										
TR-BOLU										
TRDckcK01	AAC	C	A	GA	ACAA					
TRDckcK02										
TRDckcK03										
TRDckcK04										
TRDckcK05	C	T	T	T	G	G	A	G	G	A
Clustal Consensus	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Tablo 9. Devamı.

	3240	3250	3260	3270	3280	3290	3300	3310	3320	3330
Heddam					A	C		A	G	
GE-12					A			A	G	
TRBs13/H15										
TRSW13/G										
TR-BOLU										T
TRDckcK01										
TRDckcK02										
TRDckcK03										
TRDckcK04										
TRDckcK05	C	C	T	G	A	T	G	A	A	A
Clustal Consensus	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Tablo 11. RNA kodon tablosu.

		2. baz			
		U	C	A	G
1. baz	U	UUU (Phe/F) Phenylalanine	UCU (Ser/S) Serine	UAU (Tyr/Y) Tyrosine	UGU (Cys/C) Cysteine
		UUC (Phe/F) Phenylalanine	UCC (Ser/S) Serine	UAC (Tyr/Y) Tyrosine	UGC (Cys/C) Cysteine
		UUA (Leu/L) Leucine	UCA (Ser/S) Serine	UAA Ochre (<i>Sonlandırma</i>)	UGA Opal (<i>Sonlandırma</i>)
		UUG (Leu/L) Leucine	UCG (Ser/S) Serine	UAG Amber (<i>Sonlandırma</i>)	UGG (Trp/W) Tryptophan
	C	CUU (Leu/L) Leucine	CCU (Pro/P) Proline	CAU (His/H) Histidine	CGU (Arg/R) Arginine
		CUC (Leu/L) Leucine	CCC (Pro/P) Proline	CAC (His/H) Histidine	CGC (Arg/R) Arginine
		CUA (Leu/L) Leucine	CCA (Pro/P) Proline	CAA (Gln/Q) Glutamine	CGA (Arg/R) Arginine
		CUG (Leu/L) Leucine	CCG (Pro/P) Proline	CAG (Gln/Q) Glutamine	CGG (Arg/R) Arginine
	A	AUU (Ile/I) Isoleucine	ACU (Thr/T) Threonine	AAU (Asn/N) Asparagine	AGU (Ser/S) Serine
		AUC (Ile/I) Isoleucine	ACC (Thr/T) Threonine	AAC (Asn/N) Asparagine	AGC (Ser/S) Serine
		AUA (Ile/I) Isoleucine	ACA (Thr/T) Threonine	AAA (Lys/K) Lysine	AGA (Arg/R) Arginine
		AUG (Met/M) Methionine/ <i>Start</i> *	ACG (Thr/T) Threonine	AAG (Lys/K) Lysine	AGG (Arg/R) Arginine
	G	GUU (Val/V) Valine	GCU (Ala/A) Alanine	GAU (Asp/D) Aspartic acid	GGU (Gly/G) Glycine
		GUC (Val/V) Valine	GCC (Ala/A) Alanine	GAC (Asp/D) Aspartic acid	GGC (Gly/G) Glycine
		GUA (Val/V) Valine	GCA (Ala/A) Alanine	GAA (Glu/E) Glutamic acid	GGA (Gly/G) Glycine
		GUG (Val/V) Valine	GCG (Ala/A) Alanine	GAG (Glu/E) Glutamic acid	GGG (Gly/G) Glycine

Nonpolar	Polar	Bazik	Asidik	Sonlandırma
----------	-------	-------	--------	-------------

* AUG kodonu hem başlangıç kodonu hemde methionine kodonu olarak işlemektedir.

Tablo 12. BioEdit genetik analiz programı kullanılarak hazırlanan çoklu hizalanmış protein dizilimleri.

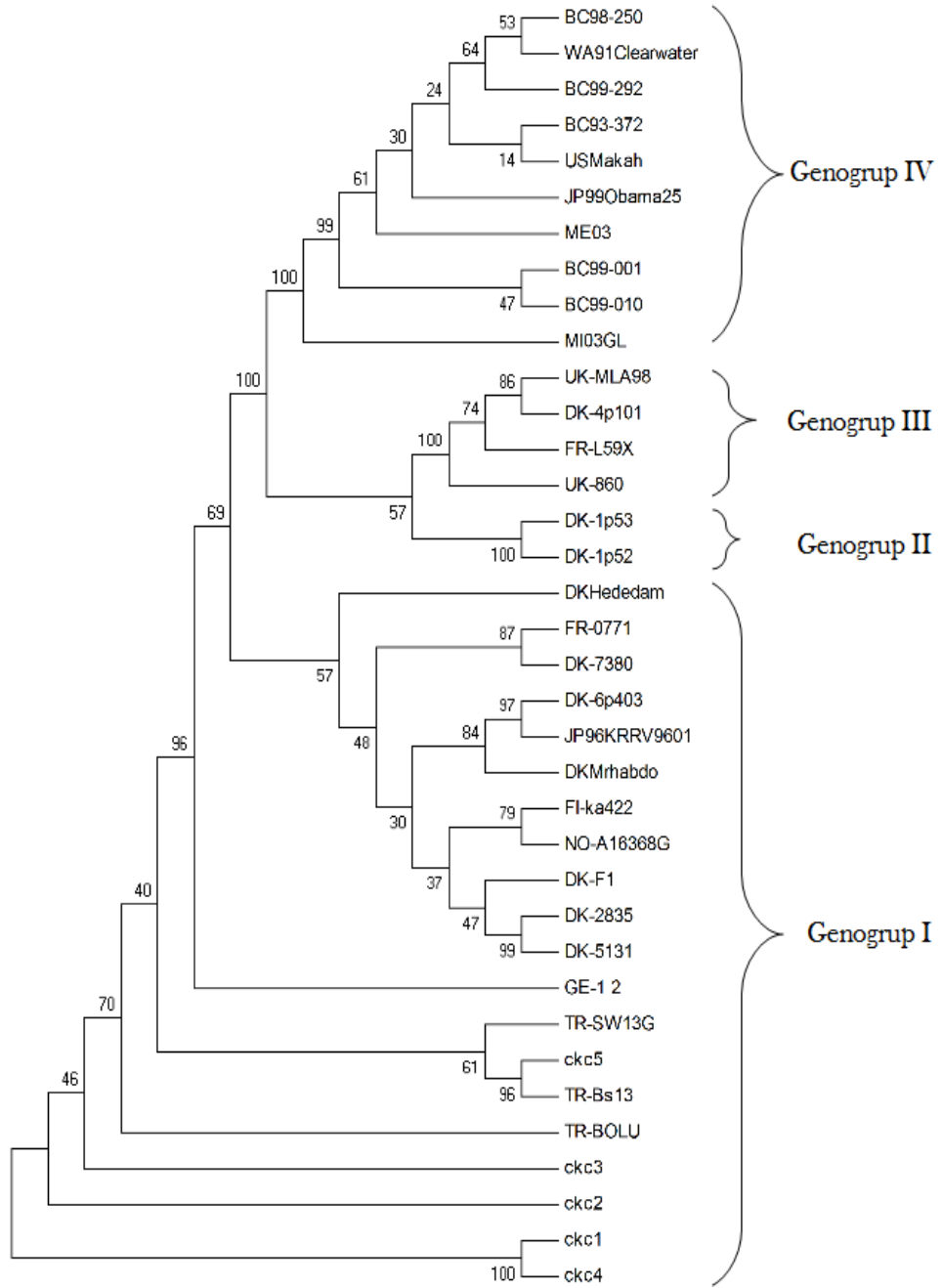
	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130
DKHedadam									
GE-1.2									
TRBs13									
TRSW13									
TR-BOLU									
TRDckcK01									
TRDckcK02									
TRDckcK03									
TRDckcK04									
TRDckcK05									
Chustal Consensus									

LTR . . . G . Q .
 FFGGQTI EKTILEAKLSRQEATNEASKDHEYPPFP E P S C I W M K N N V H K D I T H Y Y K T P K T V S V D L Y S R K F L N P D F I E G V C T T S P C Q T
 ***** * ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

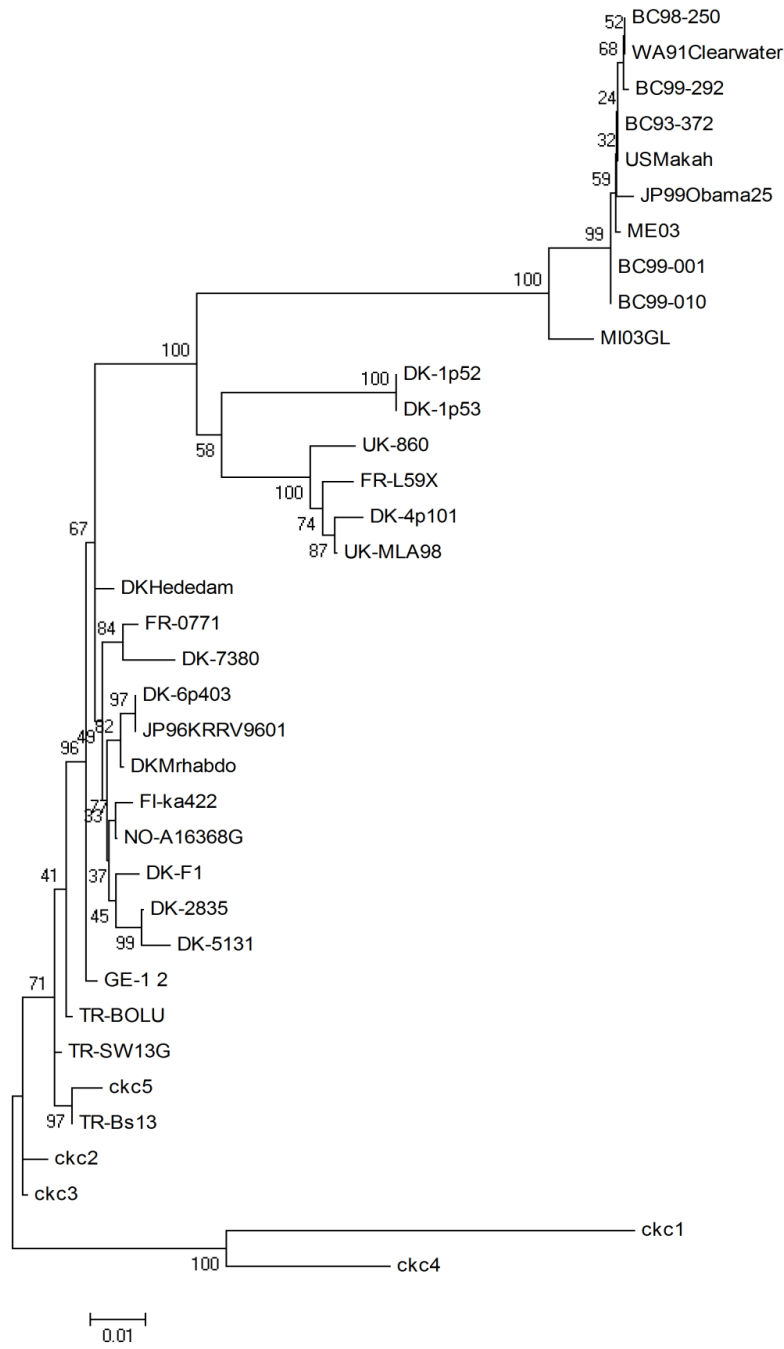
Tablo 12. *Devamı.*

	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	
DKHedadam									
GE-1.2									
TRBs13									
TRSW13									
TR-BOLU									
TRDckcK01									
TRDckcK02									
TRDckcK03									
TRDckcK04									
TRDckcK05									
Chustal Consensus									

. . . K G R R A X .
 E R R A X .
 E R R A X .
 E R R A X .
 E R R A X .
 E R R A X .
 K R R A X .
 T H Y Y K T P K T V S V D L Y S R K F L N P D F I E G V C T T S P C Q T H W Q G V Y W V G A T P T A H C P T S E T L * G H L F T T T H D H K V V K V I V A G H H P W A T
 ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****



Şekil 18. Neighbor-Joining metoduyla çizilmiş olan bootstrap konsensus filogenetik ağacı.



Şekil 19. Neighbor-Joining metoduyla çizilmiş olan bootstrap konsensus filogenetik ağacı.

6. TARTIŞMA

Avrupa’da 1963 yılında alabalık işletmelerinde tanımlanan ilk VHSV vakasının ardından, denizden ilk izolasyon 1979 yılında Atlantik cod (*Gadus morhua*) balıklarından gerçekleştirilmiştir. Kuzey Amerika’da ise 1988 de ilk izolasyon chinook salmon (*O. tshawytscha*) balıklarından gerçekleştirilmiştir. Asya kıtasında virüsün ilk izolasyonu, Japonya ve Kore’de Japon dil balığından “*Paralichthys olivaceus*” 2001 yılında yapılmıştır (70). Ülkemizde ise ilk olarak 2004 yılında TSÜMAE’de kültürü yapılan kalkan balıklarında VHSV teşhis edilmiştir (40). İki bin beş yılında ilk VHSV izolasyonu gerçekleştirilmiştir (55).

Hastalığın Avrupa’da ilk izolasyonunun ardından bazı ülkelerde tarama çalışmaları başlatılmış ve birkaç işletmeyi veya tüm ülkeyi kapsayacak eradikasyon projeleri hazırlanmıştır. Eradikasyon programının en uzun süre ve kapsamlı uygulandığı ülke olan Danimarka’da, 1965 yılında uygulanmaya başlanan VHSV eradikasyon programı sonucunda 1997 yılına gelindiğinde enfekte işletme sayısı 400’den 26’ya düşürülmüştür (56). Özellikle Baltık Denizi, Kuzey Denizi ve Norveç kıyılarında olmak üzere 69 farklı deniz balığı türünden 50.000’in üzerinde örnek toplanmak suretiyle 1999-2005 yıllarında VHSV taraması yapılmış ve 193 adet VHSV izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İngiltere’de 2007 yılında yapılan bir çalışmada, üç önemli viral balık hastalığı ISAV, IHNV ve VHSV için rutin olarak yürütülen sörvey çalışmalarının ekonomik analizi yapılmıştır. Buna göre maliyet-fayda oranı ISAV için $\geq 3,2$, VHSV için $\geq 5,8$ ve IHNV için <1 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak İngiltere’de VHSV tarama

projelerine harcanan kaynağın çok daha büyük fayda olarak geri döndüğü gösterilmiştir (51).

Mevcut çalışmayla ülkemizde ilk defa VSHH yönünden Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinden hem deniz balığı türlerinde hem de aynı bölgede yetiştiriciliği yapılan gökkuşuğu alabalığı işletmelerinde kapsamlı bir tarama yapılmıştır. Yapılan taramada hedeflenen bölge ülkemiz balıkçılığının hem tatlı su yetiştiricilik işletmeleri bakımından hem de denizden yapılan balık avcılığı bakımından en önemli bölgesidir. Deniz balıklarından yapılan örneklemelerde 12 farklı türden, toplam 3378 adet balık örneklenmiştir. Yürütülen tarama, örnek sayısı ve çeşitliliği açısından yeterli olarak görünmekle birlikte Trabzon ili dışındaki noktalardan balıkçılardan satın alma yoluyla yapılan örnekleme, balığın orijini (yakalandığı yer) hakkındaki bilginin balıkçılardan alınması nedeniyle güvenilirliği tartışılabilir. Bununla birlikte her ne kadar balıkçılardan satın alınan örneklerin orijiniyle ilgili bilgiler şüpheli olsada, bizzat araştırmacılar tarafından Trabzon ili açıklarından orta su tirolü vasıtası ile yapılan çekimler neticesinde elde edilen balıklardan da (kalkan balıkları hariç) VHSV teşhis edilememiş olması yürütülen tarama çalışmasının en önemli handikapını nispeten daha önemsiz kılmıştır. Yürütülen tarama çalışmasının diğer bir eksikliği ise örnekleme dönemlerini kapsayan son iki yıllık süreçte Karadeniz'deki doğal kalkan balıklarının popülasyonundaki ciddi azalma ve bunun neticesinde dört dönem toplam boyunca 24 adet ergin kalkan balığı örneklenebilmiş olmasıdır.

Tatlı su balıklarında örnekler Türkiye'nin Doğu Karadeniz'deki sınırından başlayarak Sakarya nehrine kadar olan bölgede bulunan ve balıkçılığın yapıldığı tüm akarsulardan en az 30 adet örnek olacak şekilde toplam 62 alabalık

işletmesinden 1089 adet porsiyonluk boydaki ve 30 adet işletmeden de yaklaşık 1500 adet alabalıktan gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle tatlı su işletmelerinden yapılan örneklemelemlerle ilgili eksiklik olarak değerlendirilecek herhangi bir durumun sözkonusu olmadığı düşünülebilir.

Yapılan hücre kültüründe virüs izolasyonu, RT-PZR ve virüs nötralizasyon çalışmalarının ardından yalnızca kalkan balıklarından VHSV teşhis edilebilmiştir. Toplam 24 adet kalkan balığından beş tanesi (% 20,8) VHSV yönünden pozitif bulunmuştur. Bu sonuçlar Karadeniz'deki kalkan balığı popülasyonunda VHSV'nin endemik olduğunu göstermektedir. Karadeniz'deki kalkan balığı stoklarında son yıllardaki aşırı azalmanın sebepleri tam olarak bilinmemekle beraber VHSV'nin deneysel mortalite oranları göz önünde bulundurulduğunda, bu azalmanın VHSV ile ilgili olabileceği düşünülmektedir, bununla beraber konuyla ilgili daha fazla çalışmaya gerek vardır.

Çalışmada VHSV izole edilen kalkan balıklarının tamamının yaklaşık iki kg, üç ve üzeri yaşta oldukları gözlenmiştir. Bulgular daha önceki bulgularla da örtüşmektedir (17, 55). Bu durumun ilkbahar dönemindeki su sıcaklığı dalgalanmalarının ve üreme stresinin latent enfekte kalkan balıklarından virüs saçılımını tetiklenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (2, 9).

Özellikle Avrupa ülkelerinde alabalık yetiştiriciliğinin en önemli viral hastalığı olan VHSV'nin Avrupa'nın en büyük alabalık üreticisi olan ülkemizden (65-70 bin ton/yıl) 2006 yılındaki "Bolu" vakasının dışında hiçbir alabalık işletmesinde VHSV rapor edilmemiş olması oldukça ilgi çekicidir.

Ayrıca, enfeksiyon denemeleri, "BOLU" izolatu da dâhil tüm Türkiye izolatlarının, Karadeniz dere alabalıklarında (*Salmo trutta labrax*) apatojen veya

düşük patojenitede olduklarını göstermektedir. Bu konunun aydınlatılması için gelecekte daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Nishizawa ve ark. (55) TR-TB13/H15 ve TR-SW13/G izolatlarıyla kalkan larvaları ve alabalık parmakboylarında yapılan ve 14 gün süren enfeksiyon denemesine dayanarak izolatların kalkan ve alabalıklar için apatojen veya düşük patojenitede olabileceklerini belirtmektedirler. Buna karşın mevcut çalışmada kalkan balıklarına İP enjeksiyon yoluyla 10^2 DKID₅₀ miktarında virüs verildiğinde TR-TB13/H15 izolatının %43,3, TR-SW13/G izolatının ise %78,3 mortaliteye sebep olduğunu göstermiştir. Aynı izolatlarla immersiyon yoluyla yapılan enfeksiyon denemesinde TR-TB13/H15 izolatı %11,7 mortalite yapmıştır. TR-SW13/G izolatı için immersiyon yoluyla yapılan enfeksiyon denemesi, deneme tankındaki teknik bir aksalıktan dolayı gerçekleştirilememiştir.

Kalkan balıkları (*Psetta maxima*) için ise bir izolatın (ckc5) apatojen, 7 izolatın ise oldukça patojen olduklarını göstermiştir. Bu yedi izolattan iki tanesi diğerlerine göre nispeten daha düşük patojenitede (İP enjeksiyon yoluyla TRDckcK01; %48,3, TR-TB13/H15; %43,3) bulunmuştur. Geriye kalan beş virüsün oldukça yüksek mortaliteye (İP enjeksiyon yoluyla TRDckcK02; %88,3, TRDckcK03; %93,3, TRDckcK04; %91,7, TR-BOLU; %86,7, TR-SW13/G; %78,3) sebep olduğu görülmektedir. İmmersiyon yoluyla yapılan enfeksiyon denemelerinin sonuçları literatür bilgilerini doğrular nitelikte İP enjeksiyon yoluyla yapılan denemelerde gözlenen mortaliteye göre çok daha düşük olarak gözlenmiştir.

Enfeksiyon denemelerin sonuçlarına göre mortalite oranları günlük olarak incelendiğinde ölümlerin uygulamadan sonraki 10-15. günlerde başladığı göze

çarpmaktadır. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda, 2005 yılında kalkan larvalarında, TB13/H15 ve SW13/G izolatları ile gerçekleştirilen enfeksiyon denemelerinde virüslerin patojeniteleriyle ilgili fikir ileri sürebilmek için denemelerin süresinin çok kısa tutulmuş olabileceği söylenebilir. Aynı izolatlarla alabalıklar üzerinde yapılan enfeksiyon denemeleri ise birbiriyle örtüşmektedir.

Viral hemorajik septisemi virüsü G geninde yapılan bir yönlendirilmiş mutasyon çalışmasında, 82-109. aminoasitlerinin oluşturduğu bölgenin fosfolipid bağlanma bölgesi ve 142-159. bölgeninde füzyon peptidi olduğu EPC hücre hatları üzerinde gösterilmiştir (59, 60). Benzer şekilde 1999 yılında Gaudin ve ark., tarafından yapılan bir çalışmada da 135-161. ile 431-433. amino asit bölgeleri üzerinde araştırmalar yapılmış ve buna göre bu mutasyonların virüsün virülensini etkilediğini göstermişlerdir (28).

Hem alabalıklarda hemde kalkan balıklarında apatojen görünen TRDckcK05 izolatına ait sekans sonuçları ClustalW genetik analiz programı kullanılarak yapılan çoklu hizalama dikkatle incelendiğinde analiz edilen G genine ait 518 bazlık (3017-3535) korunmuş bölgede, aminoasit dizilimini de etkileyen bazı mutasyonlar göze çarpmaktadır. Özellikle 3457, 3476, 3491, 3503 ve 3530. nükleotitlerdeki mutasyonlar incelendiğinde aa dizilimini etkiledikleri görülmektedir. Nükleotit sekansının 3457. pozisyonunda meydana gelen mutasyon kodonun ilk nükleotidini T haline getirmiş ve diğer izolatlarda lysine, glysine ya da glutamik asitten birisinin geldiği 1153. pozisyonu (TAA) kodonuya kodlanan sonlandırma kodonuna dönüşmüştür. Benzer şekilde 3476, 3491, 3503 ve 3530. nükleotitlerde de yalnızca TRDckcK05 izolatında görülen mutasyonların varlığı tespit edildi. Bu bölgelerdeki mutasyonlar aa diziliminde sırasıyla 1159.

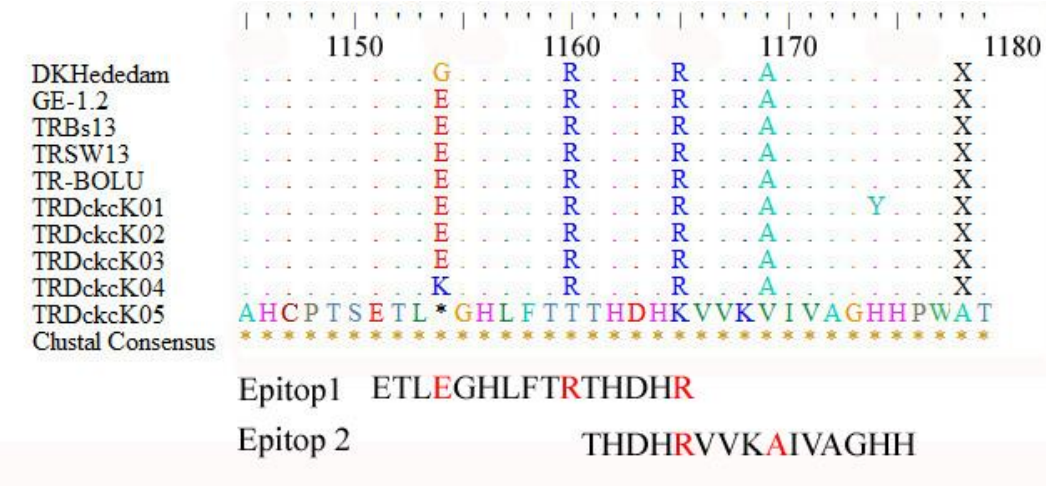
pozisyonlarda diğer tüm izolatlarda arginin kodlanırken TRDckcK05 izolatında yerini threonin almıştır. 1164. pozisyonda incelenen diğer tüm izolatlarda arginin kodlanırken TRDckcK05'te yerini lysine almıştır. 1168. pozisyonda ise diğerlerinde alanin gelmesine karşın TRDckcK05 izolatu sekansında yerine valin aa kodlanmıştır. Son olarak 1177. pozisyonda sadece TRDckcK05 izolatında görülen bir insersiyon bulunmaktadır, bu mutasyona bağlı olarak diğer tüm izolatlarda glyisine bulunan noktada TRDckcK05 izolatında alanin yer almıştır (Şekil 17).

Bu tez çalışmasında tespit edilen mutasyon bölgeleri incelendiğinde ise özellikle 1153 ve 1159. pozisyonda bulunan mutasyonlar dikkati çekmektedir. Bu noktalardaki mutasyonlardan birinde sonlandırma kodunu diğerinde ise polar (threonin) olan ve O-glikozilasyon ve fosforilasyonun mümkün olduğu bir aa ile bazik (arginin) karakterde ve O-glikozilasyonu ve fosforilasyona uygun olmayan bir aa yer almıştır.

Diğer üç mutasyon bölgesinde meydana gelen aa değişimleri ile yer değiştiren aa'lar (arginin/lysine, alanin/glyisine ve alanin/valin) benzer karakterde olan aa'lardır. Bu ise gerçekleşen değişimlerin önemsiz olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan analizler dikkatle incelendiğinde göze çarpan korunmuş motifler ve yoğun mutasyonların olduğu bölgeler görülmektedir. Neredeyse incelenen tüm izolatlarda korunmuş olmasına rağmen ckc5 izolatında farklılık gösteren bölgelerin varlığı gösterilmiştir. Dizileme sonuçları bağışıklıkla ilgili epitoplardan bakımından tarandığında (Immune Epitope Database and Analysis Resource) 106403 koduyla kaydedilmiş "ETLEGHLFTRTHDHR" ve 106902 koduyla

kaydedilmiş “THDHRVVKAIVAGHH” epitoplarının ckc5 izolatında önemli derecede farklılık gösterdiği görülmektedir (8).



Şekil 20. Epitop bölgesindeki mutasyonlar.

Viral G geninin incelenen kısmındaki mutasyonların ckc5 izolatının kalkan balıklarında neden mortalite yapmadığına ilişkin yorumda bulunabilmek için konu üzerinde daha detaylı çalışmalar yapmaya gerek vardır.

Daha önceden ifade edildiği gibi ülkemiz alabalık üretiminde bölgesinin ve Avrupa'nın en büyük üreticisi konumundadır. Deniz balıklarından ise özellikle çipura ve levrek üretim seviyesi oldukça yüksektir ve son yıllarda balıkçılık ülkemizin lokomotif sektörlerinden biri olmuştur. Avrupa'da başlıca İngiltere, Fransa, İspanya ve Almanya yassı balık üretimi bakımından oldukça ileri seviyededirler. Ülkemizde ise halen bir özel sektör kuruluşu kültür ortamında kalkan balıkları yetiştirmektedir. Bununla beraber artan üretim ve düşen kar payları yetiştiricileri yeni tür arayışlarına itmiş ve pek çok işletme yeni türleri yetiştirmeye başlamışlardır. Ülkemiz balıkçılığının günümüzdeki yapısı dikkatle

incelendiğinde kısa sürede yassı balık üretiminde de oldukça ileri seviyelere gelebileceği görülmektedir.

Yapılan çalışma ile elde edilen veriler önümüzdeki yıllarda özellikle yassı balık yetiştiriciliği bakımından karşılaşılabilecek en önemli problemlerin başında gelen VHSV hakkındaki bilgi boşluğunu doldurmuştur. Buna ilaveten yapılan tez çalışması bundan sonra yapılacak olan çalışmalar için önemli bir kaynak niteliğindedir.

Mevcut tez çalışması sonucunda, ülkemizde VHSV'nin sadece kalkan balıklarında izole edilmesi balık yetiştiriciliği açısından sevindirici bulunmuştur. Ancak, virüsün bugün için yalnızca bir türde bulunsa dahi, diğer balıkların bu virüsün konakçıları olmaları ve virüslerin doğası dikkate alındığı zaman, bu virüsün gelecek için ülkemiz balıkçılığında önemli bir risk oluşturabileceği görülmektedir. Ayrıca, bu hastalıkla ve ülkemizde izole edilen izolatlarla ilgili daha detaylı çalışmaların yapılması hem ülkemiz için bu virüsle mücadele açısından önemli veriler sağlayacak hem de bu virüsle ilgili yeni bilimsel verilerin temin edilmesine katkıda bulunacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Acosta F, Collet B, Lorenzen N, Ellis AE. (2006). Expression of the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) on the surface of the fish cell line RTG-P1 induces type 1 interferon expression in neighbouring cells. *Fish Shellfish Immunol* 21: 272-278.
2. Acosta F, Petrie A, Lockhart K, Lorenzen N, Ellis AE. (2005). Kinetics of Mx expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to VHS–DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol* 18: 81-89.
3. Adelman M, Köllner B, Bergmann SM, Fischer U, Lange B, Weitschies W, Enzmann PJ, Fichtner D. (2008). Development of an oral vaccine for immunisation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against viral haemorrhagic septicaemia. *Vaccine* 26: 837-834.
4. Alonso MF, Alvarez F, Estepa A, Coll JM. (1999). G disulphide bond native conformation is required to elicit trout neutralizing antibodies against VHSV. *J Fish Diseases* 22: 219-222.
5. Alonso MF, Coll JM. (1999). Fusion of VHSV persistently infected fish cells. *J Fish Diseases* 22: 401-406.
6. Alonso MF, Kim CH, Johnson MC, Pressley M, Leong JA. (2004). The NV of Snakehead Rhabdovirus (SHRV) Is Not Required for Pathogenesis, and a Heterologous Glycoprotein Can Be Incorporated into the SHRV Envelope. *J Virol* 78: 5875-5882.
7. Alonso MF, Rocha A, Coll JM. (2001). DNA vaccination by immersion and ultrasound to trout viral haemorrhagic septicaemia virus. *Vaccine* 19: 3067-6075.
8. Anonim. (2010). Epitope Information. Erişim: (www.iedb.org). Erişim tarihi: 28.01.2010.
9. Anonim. (2004). İhbarı Mecburi Hayvan Hastalıkları. Erişim: (http://www.kkgm.gov.tr/birim/hay_sagl/ihb_mec_hast.html). Erişim tarihi: 30.07.2009.
10. Anonim. Metamorphosis. Erişim: (<http://en.wikipedia.org/wiki/Metamorphosis>). Erişim tarihi: 30.07.2009.
11. Anonim. Smoltification. Erişim: (<http://www.fishbase.org/glossary/Glossary.php?q=smoltification>). Erişim tarihi: 30.07.2009.
12. Anonim. (2009). Viral Haemorrhagic Septicemiae. Erişim: (<http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/2.3.09.VHS.pdf>). Erişim tarihi: 30.07.2009.
13. Betts AM and Stone DM. (2000). Nucleotide Sequence Analysis of the Entire Coding Regions of Virulent and Avirulent Strains of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus. *Virus Genes* 20: 259-262.
14. Betts AM, Stone DM. (2001). Rescue of viral haemorrhagic septicaemia virus minigenomes by helper virus. *Virus Res* 77: 19-23.
15. Biacchesi S, Béarzotti M, Bouguyon E, Brémont M. (2002). Heterologous Exchanges of the Glycoprotein and the Matrix Protein in a Novirhabdovirus. *J Virol* 76:2881-2889.

16. Biacchesi S, Thoulouze MI, Béarzotti M, Yu YX, Brémont M. (2000). Recovery of NV Knockout Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Expressing Foreign Genes. *J Virol* 74: 11247-11253.
17. Boudinot P, Salhi S, Blanco M, Benmansour A. (2001). Viral haemorrhagic septicaemia virus induces vig -2, a new interferon-responsive gene in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol* 11: 383-397.
18. Bowden, T. J. (2003). A study of the susceptibility of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), to viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J Fish Diseases* 26: 207-212.
19. Collet B, Hovens GCJ, Mazzoni D, Hirono I, Aoki T, Secombes C. (2003). Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interferon regulatory factor 1 and 2 (IRF-1 and IRF-2). *Dev Comp Immunol* 27: 111-126.
20. Cupit PM, Lorenzen N, Strachan G, Kemp GJL, Secombes CJ, Cunningham C. (2001). Neutralisation and binding of VHS virus by monovalent antibody fragments. *Virus Res* 81: 47-56.
21. Eléouët JF, Druesne N, Chilmonczyk S, Monge D, Dorson M, Delmas B. (2001). Comparative Study of In-situ Cell Death Induced by the Viruses of Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) and Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) in Rainbow Trout. *J Comp Path* 124: 300-307.
22. Elsayed E, Faisal M, Thomas M, Whelan G, Batts W, Winton J. (2006). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from muskellunge, *Esox masquinongy* (Mitchill), in Lake St Clair, Michigan, USA reveals a new sublineage of the North American genotype. *J Fish Disease* 29: 611-619.
23. Enzmann PJ, Fichtner D, Schütze H, Walliser G. (1998). Development of vaccines against VHS and IHN oral application, molecular marker and discrimination of vaccinated fish from infected populations. *J. Appl. Ichthyol.* 14: 179-183. *J Appl Ichthyol* 14: 179-183.
24. Fabregas J, García D, Alonso MF, Rocha AI, Puertas PG, Escribano JM, Otero A, Coll JM. (1999). In vitro inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae. *Ant. Antiviral Res* 44: 67-73.
25. Falco A, Chico V, Marroquí L, Perez L, Coll JM, Estepa A. (2008). Expression and antiviral activity of a defensin-like peptide identified in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EST sequences. *Mol Immunol* 45: 757-765.
26. Falco A, Mas V, Tafalla C, Perez L, Coll JM, Estepa A. (2007). Dual antiviral activity of human alpha-defensin-1 against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV): Inactivation of virus particles and induction of a type I interferon-related response. *Antiviral Res* 76: 111-123.

27. Gagné N, MacKinnon AM, Boston L, Souter B, Versloot MC, Griffiths S, Olivier G. (2007). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from mummichog, stickleback, striped bass and brown trout in eastern Canada. *J Fish Diseases* 30: 213-223.
28. Gaudin Y, Kinkelin PD and Benmansour A. (1999). Mutations in the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus that affect virulence for fish and the pH threshold for membrane fusion. *J Gen Virol* 80: 1221–1229.
29. Graham DA, Staples C, Wilson CJ, Jewhurst H, Cherry K, Gordon A, Rowley HM. (2007). Biophysical properties of salmonid alphaviruses influence of temperature and pH on virus survival. *J Fish Diseases* 30: 533-543.
30. Granzow H, Weiland F, Fichtner D, Enzmann PJ. (1997). Studies of ultrastructure and morphogenesis of fish pathogenic viruses grown in cell culture. *J Fish Disease* 20: 1-10.
31. Henryon M, Berg P, Olesen NJ, Kjær TE, Slierendrecht WJ, Jokumsen A, Lund I. (2005). Selective breeding provides an approach to increase resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to the diseases, enteric redmouth disease, rainbow trout fry syndrome, and viral haemorrhagic septicaemia. *Aquaculture* 250: 621-636.
32. Henryon M, Jokumsen A, Berg P, Lund I, Pedersen PB, Olesen NJ, Slierendrecht WJ. (2002). Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout. *Aquaculture* 209: 59–76.
33. Heras AI de las, Jean SRS, Prieto SIP. (2008). Salmonid fish viruses and cell interactions at early steps of the infective cycle. *Journal of Fish Diseases*. *J Fish Diseases* 37: 535-546.
34. Hershberger PK, Gregg J, Pacheco C, Winton J, Richard J, Traxler G. (2007). Larval Pacific herring, *Clupea pallasii* (Valenciennes), are highly susceptible to viral haemorrhagic septicaemia and survivors are partially protected after their metamorphosis to juveniles. *J Fish Diseases* 30: 445-458.
35. Higgins D, Thompson J, Gibson T. and Thompson J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
36. Isshiki T, Nishizawa T, Kobayashi T, Nagano T, Miyazaki T. (2001). An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis Aquat Org* 47: 87–99.
37. Jensen KE, Winton J, Lorenzen N. (2005). Genotyping of the fish rhabdovirus, viral haemorrhagic septicaemia virus, by restriction fragment length polymorphisms. *Vet Microbiol* 106: 167–178
38. Jimenez N, Coll J, Salguero FJ, Tafalla C. (2006). Co-injection of interleukin 8 with the glycoprotein gene from viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) modulates the cytokine response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vaccine* 24: 5615–5626.
39. Johnson MC, Simon BE, Kim CH, Leong JAC. (2000). Production of Recombinant Snakehead Rhabdovirus: the NV Protein Is Not Required for viral Replication. *J Virol* 74: 2343-2350.

40. Kalayci G, Incoglu S, Ozkan B (2006). First isolation of Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus from turbot (*Scophthalmus maximus*) cultured in the Trabzon coastal area of the Black Sea in Turkey. *Bull Eur Ass Pathol* 26: 157-161.
41. Knüsel R, Bergmann SM, Jensen KE, Casey J, Segner H, Wahli T. (2007). Virus isolation vs RT-PCR which method is more successful in detecting VHSV and IHNV in fish tissue sampled under field conditions. *J Fish Diseases* 30: 559–568.
42. Knuesel R, Segner H, Wahli T. (2003). A survey of viral diseases in farmed and feral salmonids in Switzerland. *J Fish Diseases* 26: 167–182.
43. Kurita J, Lida Y, Nakajima K, Inouye K. (2002). Virucidal Effects of Various Disinfectants on Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) Isolated. *Fish Pathol* 37: 175-181.
44. Kuzmin IV, Novella IS, Dietzgen RG, Padhi A, Rupprecht CE. (2009). The rhabdoviruses: Biodiversity, phylogenetics, and evolution. *Infection, Genet Evol* 9: 541–553.
45. Lida H, Mori KI, Nishizawa T, Arimoto M, Muroga K. (2003). Fate of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus in Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* Challenged by Immersin. *Fish Pathol* 38: 87-91.
46. Lorenzen N, Lorenzen E, Jensen KE, LaPatra SE. (2002) Immunity induced shortly after DNA vaccination of rainbow trout against rhabdoviruses protects against heterologous virus but not against bacterial pathogens. *Dev Comp Immunol* 26: 173-179.
47. Lorenzen N, Lorenzen E, Jensen KE, Heppell J, Wu T, Davis H. (1998). Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. *Fish & Shellfish Immunol* 8: 261–270.
48. Mas V, Rocha A, Perez L, Coll JM, Estepa A. (2004). Reversible Inhibition of Spreading of In Vitro Infection and Imbalance of Viral Protein Accumulate at Low pH in Viral Hemorrhagic Septicemia Rhabdovirus, a Salmonid Rhabdovirus. *J Virol* 78: 1936–1944.
49. McLauchlan PE, Collet B, Ingerslev E, Secombes CJ, Lorenzen N, Ellis AE. (2003). DNA vaccination against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in rainbow trout: size, dose, route of injection and duration of protection—early protection correlates with Mx expression. *Fish & Shellfish Immunol* 15: 39–50.
50. Micol V, Caturla N, Fons LP, Más V, Pérez L, Estepa A. (2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Res* 66: 129–136.
51. Moran D, Fofana A. (2007). An economic evaluation of the control of three notifiable fish diseases in the United Kingdom. *Prev Vet Med* 80: 193–208.
52. Mortensen HF, Heuer OE, Lorenzen N, Otte L, Olesen NJ. (1999). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. *Virus Res* 63: 95–106.

53. Mourton C, Romestand B, De Kinkelin P, Jeffroy J, Le Gouvello R, Pau B. (1992). Highly Sensitive Immunoassay for Direct Diagnosis of Viral Hemorrhagic Septicemia Which Uses Antinucleocapsid Monoclonal Antibodies. *J Clin Microbiol* 30: 2338-2345.
54. Nishizawa T, Iida H, Takano R, Isshiki T, Nakajima K, Muroga K. (2002). Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) based on partial G and P genes. *Dis Aquat Org* 48: 143-148.
55. Nishizawa T, Savaş H, Işidan H, Üstündağ C, Iwamoto H, Yoshimizu M. (2006). Genotyping and Pathogenicity of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus from Free-Living Turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish Coastal Area of the Black Sea. *Appl Environ Microbiol* 72: 2373-2378.
56. Olesen, N. (1998). Sanitation of viral haemorrhagic septicaemia (VHS). *J Appl Ichthyol* 14: 173-177.
57. Pakingking RJ, Okinaka Y, Mori K, Arimoto M, Muroga K, Nakai T. (2004). In vivo and in vitro analysis of the resistance against viral haemorrhagic septicaemia virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) preceedingly infected with aquabirnavirus. *Fish & Shellfish Immunol* 17: 1-11.
58. Quillet E, Dorson M, Le Guillou S, Benmansour A, Boudinot P. (2007). Wide range of susceptibility to rhabdoviruses in homozygous clones of rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunol* 22: 510-519.
59. Rocha A, Fernandez-Alonso M, Mas V, Perez L, Estepa A, Coll JM. (2002). Antibody response to a fragment of the protein G of VHS rhabdovirus in immunised trout. *Vet Immunol Immunopathol* 86: 89-99.
60. Rocha A, Ruiz S, Tafalla C, Coll JM. (2004). Characterisation of the syncytia formed by VHS salmonid rhabdovirus G gene transfected cells. *Vet Immunol Immunopathol* 99: 143-152.
61. Saitou N & Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
62. Schütze H, Mundt E, & Mettenleiter TC. (1999). Complete Genomic Sequence of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus, a Fish Rhabdovirus. *Virus Genes* 19: 59-65.
63. Skall HF, Kjær TE, Olesen NJ. (2004). Investigation of wild caught whitefish, *Coregonus lavaretus* (L.), for infection with viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and experimental challenge of whitefish with VHSV. *J Fish Diseases* 27: 401-408.
64. Skall HF, Olesen NJ, Mellergaard S. (2005). Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming – a review. *J Fish Diseases* 28: 509-529.
65. Slierendrecht WJ, Olesen NJ, Madsen HRJ, Lorenzen N, Henryon M, Berg P, Søndergaard J, Koch C. (2001). Rainbow trout offspring with different resistance to viral haemorrhagic septicaemia. *Fish & Shellfish Immunol* 11: 155-167.
66. Smail DA, Bain N, Bruno DW, King JA, Thompson F, Pendrey DJ, Morrice S, Cunningham CO. (2006). Infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-

- smolts in the Shetland Isles, Scotland: virus identification, histopathology, immunohistochemistry and genetic comparison with Scottish mainland isolates. *J Fish Disease* 29: 31-41.
67. Snow M, King JA, Garden A, Raynard RS. (2005). Experimental susceptibility of Atlantic cod, *Gadus morhua* (L.), and Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), to different genotypes of viral haemorrhagic septicaemia virus. *J Fish Diseases* 28: 737-742.
 68. Tafalla C, Figueras A, Novoa B. (1998). In vitro interaction of viral haemorrhagic septicaemia virus and leukocytes from trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Vet Immunol Immunopathol* 62: 359-366.
 69. Tafalla C, Novoa B. (2001). Respiratory burst of turbot (*Scophthalmus maximus*) macrophages in response to experimental infection with viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Fish & Shellfish Immunol* 11: 727-734.
 70. Takano R, Nishizawa T, Arimoto M, Muroga K. (2000). Isolation of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bull Eur Ass Pathol* 20: 186-192.
 71. Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
 72. Tamura K, Nei M & Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci* 101: 11030-11035.
 73. Thoulouze MI, Bouguyon E, Carpentier C, Brémont M. (2003). Essential Role of the NV protein of Novirhabdovirus for Pathogenicity in Rainbow trout. *J Virol* 78: 4098-4107.
 74. Thrusfield M. (2007). *Veterinary Epidemiology* içinde Assaying Antibodies, (sayfa. 307-308). Singapur: Blackwell Publishing.
 75. Utke K, Bergmann S, Lorenzen N, Köllner B, Ototake M, Fischer U. (2007). Cell-mediated cytotoxicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, infected with viral haemorrhagic septicaemia virus. *Fish & Shellfish Immunol* 22: 182-196.
 76. Vázquez CL, Dopazo CP, Olveira JG, Barja JL, Bandín I. (2006). Development of a rapid, sensitive and non-lethal diagnostic assay for the detection of viral haemorrhagic septicaemia virus. *J Virol Methods* 133: 167-174.
 77. Vázquez CL, Dopazo CP, Olveira JG, Barja JL, Bandín I. (2007). Experimental infection of turbot, *Psetta maxima* (L.), with strains of viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from wild and farmed marine fish. *J Fish Diseases* 30: 303-312.
 78. Walker PJ and Kongsuwan K. (1999). Deduced structural model for animal rhabdovirus glycoproteins. *J Gen Virol* 80: 1211-1220.
 79. Watanabe L, Pakinking RJ, Lida H, Nishizawa T, Lida Y, Arimoto M, Muroga K. (2002). Isolation of Aquabirnavirus and Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) from Wild Marine Fishes. *Fish Pathol* 37: 189-191.

ÖZGEÇMİŞ

Üç Şubat 1980’de Tokat’ta dünyaya geldim. İlk ve ortaokulu Tokat’ta tamamladıktan sonra Ankara Laborant Meslek Lisesi’nde lise öğrenimimi yatılı olarak 1997 yılında tamamladım. Bin dokuz yüz doksan sekiz yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nde üniversite öğrenimime başladım. Aynı yıl Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde Laborant olarak çalışmaya başladım. Üniversite öğrenimim boyunca başlıca teşhis ve kuduz laboratuvarlarında görev yaptım. İki bin üç yılında Veteriner Fakültesi’nden mezun oldum. İki bin dört yılında viroloji anabilim dalında doktora öğrenimime başladım. Aynı yıl Samsun Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü’ne Veteriner Hekim olarak atandım.

İki bin beş yılında JICA (Japon İşbirliği Ajansı) ile ortaklaşa yürütülen “Sürdürülebilir Kalkan Balığı Yetiştiriciliği” projesinde çalışmak üzere Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü’ne atandım. İki bin altı yılında Japonya’da National Fisheries University tarafından verilen “Fish and Fish Borne Disease” adlı eğitime katıldım. Halen Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü’nde araştırmacı veteriner hekim olarak çalışmaktayım.