



T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞU KARADENİZ BÖLGESİNDEKİ ALABALIK
KULUÇKAHANELERİNDE VE YAVRU ALABALIKLARDA
BAZI VİRAL ETKENLERİN ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Hüseyin ALP

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER VİROLOJİ ANABİLİM DALI

**I. Danışman
Yrd. Doç. Dr. Sibel HASIRCIOĞLU**

**II. Danışman
Prof. Dr. Oya BULUT**

BURDUR-2017



T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞU KARADENİZ BÖLGESİNDEKİ ALABALIK
KULUÇKAHANELERİNDE VE YAVRU ALABALIKLARDA
BAZI VİRAL ETKENLERİN ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Hüseyin ALP

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER VİROLOJİ ANABİLİM DALI

**I. Danışman
Yrd. Doç. Dr. Sibel HASIRCIOĞLU**

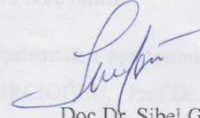
**II. Danışman
Prof. Dr. Oya BULUT**

BURDUR-2017

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Hüseyin ALP tarafından Yrd.Doç.Dr.Sibel HASIRCIOĞLU yönetiminde hazırlanan *Doğu Karadeniz Bölgesindeki Alabalık Kuluçkahanelerinde ve Yavru Alabalıklarda Bazı Viral Etkenlerin Araştırılması* başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Viroloji Anabilim Dalında (*Yüksek Lisans Tezi*) olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

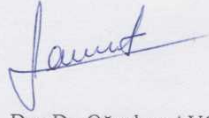
Tez Savunma Tarihi
26/12/2017



Doç.Dr. Sibel GÜR

Afyon Kocatepe
Üniversitesi
Veteriner Fakültesi

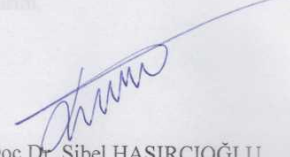
Başkan



Doç.Dr. Oğuzhan AVCI

Selçuk Üniversitesi
Veteriner Fakültesi

Jüri



Yrd.Doç.Dr. Sibel HASIRCIOĞLU

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi

Jüri

ONAY

Bu tez, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu 02/02/2018 Tarih ve ...7... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Doğa TEMİZSOYLU
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Örnekleme işlemlerinde ve laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Cemil ALTUNTAŞ, İlyas KUTLU, Mustafa TÜRE, Ali ÇANKAYA'ya, bu konuya beni yönlendiren saha ve laboratuvar çalışmalarında yardımını esirgemeyen Hacı SAVAŞ'a ve bu araştırmanın yapılması için gerekli alt yapı ile maddi desteği sağlayan Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Tezin laboratuvar çalışmaları aşamasında yardımcı olan ve imkan sağlayan, Yrd.Doç.Dr. Sibel HASIRCIOĞLU, Prof.Dr. Oya BULUT, Prof. Dr. Yakup YILDIRIM, Prof. Dr. Mehmet KALE, Arş. Gör. Dr. Kamil ATLI, Arş.Gör. Hasbi Sait SALTİK'a teşekkür ederim.


Yüksek lisans eğitimim ve tez aşamasında bana her zaman destek olan eşim, ailem, iş arkadaşlarım ve dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

BEYAN

Doğu Karadeniz Bölgesindeki Alabalık Kuluçkahanelerinde ve Yavru Alabalıklarda Bazı Viral Etkenlerin Araştırılması başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

26/12/2017

Hüseyin ALP



ONAY

ONAY

Yrd. Doç. Dr. Sibel HASIRCIOĞLU

Prof.Dr. Oya BULUT

I. Danışman

II. Danışman

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	<i>i</i>
KABUL VE ONAY SAYFASI	<i>ii</i>
TEŞEKKÜR	<i>iii</i>
BEYAN SAYFASI	<i>iv</i>
İÇİNDEKİLER	<i>v</i>
ŞEKİLLER DİZİNİ	<i>vii</i>
TABLolar DİZİNİ	<i>viii</i>
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	<i>ix</i>
TÜRKÇE ÖZET	<i>xii</i>
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT).	<i>xiii</i>
1. VİRAL HEMORAJİK SEPTİSEMİ VİRUSU (VHSV)	1
1.1. Giriş	1
1.2. Etiyoloji	1
1.3. Epidemiyoloji	4
1.4. Klinik Belirtiler	6
1.5. Patoloji ve Bağışıklık	6
1.6. Teşhis	8
1.7. Koruma ve Kontrol	9
2. İNFEKSİYÖZ PANKREATİK NEKROZİS VİRUSU (İPNV)	12
2.1. Giriş	12
2.2. Etiyoloji	12
2.3. Epidemiyoloji	14
2.4. Klinik Belirtiler	16
2.5. Patoloji ve Bağışıklık	16
2.6. Teşhis	18
2.7. Koruma ve Kontrol	19
3. İNFEKSİYÖZ HEMATOPOETİK NEKROZİS VİRUSU (İHNv)	21
3.1. Giriş	21
3.2. Etiyoloji	21
3.3. Epidemiyoloji	22
3.4. Klinik Belirtiler	23
3.5. Patoloji ve Bağışıklık	24
3.6. Teşhis	27
3.7. Koruma ve Kontrol	28

4. EPİZOOTİK HEMATOPOETİK NEKROZİS VİRUSU (EHNV)	30
4.1. Giriş	30
4.2. Etiyoloji	30
4.3. Epidemiyoloji	31
4.4. Klinik Belirtiler	32
4.5. Patoloji ve Bağışıklık	32
4.6. Teşhis	34
4.7. Koruma ve Kontrol	34
5. GEREÇ VE YÖNTEM	36
5.1. Örnekler	36
5.2. Araştırma Metodu	37
5.3. Örneklerin Laboratuvar Nakli ve Laboratuvar Çalışmaları	37
5.4. Viral RNA/DNA Ekstraksiyonu	38
5.5. Polimer Zincir Reaksiyonu	38
5.5.1. Pozitif Kontroller	38
5.5.2. RT-PZR/ PZR Protokolleri	38
5.5.3. PZR/ RT-PZR Amplifikasyonunda Kullanılan Primerler	39
5.5.4. PZR ve RT-PZR Programı	40
5.5.5. PZR/ RT-PZR Ürünlerinin Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi	40
5.6. Virus İzolasyonu	40
5.7. İstatistik Analiz	41
6. BULGULAR	42
6.1. Alabalık İşletmelerinde Elde Edilen Genel Bulgular	42
6.2. İPNV Jel Elektrofresis Görüntüsü	45
6.3. İPNV İzolasyon görüntüleri	45
6.4. İstatistik Analiz Sonuçları	46
7. TARTIŞMA	48
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	54
9. KAYNAKLAR	56
10. ÖZGEÇMİŞ	98

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	<i>Rhabdoviridae</i> ailesine ait virusların N geni kısmi DNA dizi analizine göre neighbor-joining metoduyla yapılmış filogenetik ağacı	2
Şekil 1.2.	Viral hemorajik sepsisemi virusunun kısmi G geni sekansına (nt 361'den 720'ye) göre şekillendirilmiş filogenetik ağacı	4
Şekil 5.1	Örnek alınan alabalık türleri	36
Şekil 5.2	Örneklerin laboratuvar çalışmalarına hazırlanması	37
Şekil 6.1	İPNV jel görüntüsü pozitif örnekler	45
Şekil 6.2	Normal ve CPE oluşan İPNV pozitif hücre kültürleri	45

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1.	Çeşitli dezenfektanların VHSV üzerine virusidal etkileri	11
Tablo 2.1.	İPNV suşlarının serum nötralizasyon testine göre serotiplendirilmesi ve genetik analize göre genogruplara ayrılması	13
Tablo 5.1.	İPNV, İHNV, VHSV için RT-PZR karışım	38
Tablo 5.2.	EHNV için klasik PZR karışım	39
Tablo 5.3.	PZR ve RT-PZR’nda kullanılan primerler	39
Tablo 5.4.	PZR ve RT-PZR’nda kullanılan ısı döngüsü	40
Tablo 6.1.	Örnek sayıları, RT-PZR/PZR ve virus izolasyon sonuçları	43
Tablo 6.2.	Örnekleme zamanlarındaki su sıcaklıkları	44
Tablo 6.3.	İllere göre RT-PZR sonuçları	46
Tablo 6.4.	Balık türlerine göre RT-PZR sonuçları	46
Tablo 6.5.	Yaşlara göre RT-PZR sonuçları	47
Tablo 6.6.	Hücre kültürü türlerine göre virus izolasyon sonuçları	47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µl	:	Mikrolitre
BF-2	:	Bluegill fry-2
bp	:	Baz Çifti
CD8	:	Sitotoksik T lenfositleri
CHSE-214	:	Chinook salmon embriyo
CPE	:	Sitopatik etki
dk	:	Dakika
DKID ₅₀	:	Doku kültürü enfektif doz %50
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
dNTP Mix	:	Deoksinükleosid trifosfat karışımı
DW2	:	Bidistile su
EAVC	:	Erken antiviral cevap
EBSS	:	EARL's dengeli tuz solüsyonu
ECV	:	Avrupa yayın balığı virusu
EHNV	:	Epizootik hematopoetik nekrozis virusu
ELİSA	:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPC	:	Epithelioma papulosum cyprini
FBS	:	Fetal bovine serum
fg	:	Femtogram
FHM	:	Fathead minnow
G protein	:	Glikoprotein
HBSS	:	Hank's balanced salt solution
İFAT	:	İndirekt Floresans Antikor Tekniği
İFN	:	İnterferon

İRF	:	İnterferon düzenleyici faktör
IU	:	İnternasyonal ünite
İHN	:	İnfeksiyöz hematopoetik nekrozis
İHNH	:	İnfeksiyöz hematopoetik nekrozis hastalığı
İHNV	:	İnfeksiyöz hematopoetik nekrozis virüsü
İL-1	:	İnterlöykin -1
İPN	:	İnfeksiyöz pankreatik nekrozis
İPNV	:	İnfeksiyöz pankreatik nekrozis virüsü
mM	:	Milimol
MHC-I	:	Major histocompatibility complex-1
mJ	:	Milijoule
Mx	:	Myxovirus rezistans proteini
N geni	:	Nükleoprotein geni
NO	:	Nitrik oksit
°C	:	Santigrat derece
OİE	:	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
ORF	:	Open reading frame
ÖBL	:	Ön böbrek lökositleri
Pg	:	Pikogram
pH	:	Hidrojen iyon konsantrasyonu
pmol	:	Pikomol
poly I:C	:	Poliinosinik-polisitidilik asit
QTL	:	Quantitative Trait Loci
RNA	:	Ribo nükleik asit
RTG-2	:	Rainbow trout gonad
RT-LAMP	:	Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification

RT-PZR	:	Tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu
SAF-1	:	Sea bream fins
SAVC	:	Sipesifik antiviral cevap
TAE	:	Tris-acetate EDTA
TLR 8	:	Tull like reseptör 8
TNF	:	Tümör nekrozis faktör
USAVC	:	Uzun süreli antiviral cevap
UV	:	Ultraviyole
VHS	:	Viral hemorajik septisemi
VHSH	:	Viral hemorajik septisemi hastalığı
VHSV	:	Viral hemorajik septisemi virüsü
Vig-8	:	Virüs indükleyici gen

T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans Tezi

Doğu Karadeniz Bölgesindeki Alabalık Kuluçkahanelerinde ve Yavru Alabalıklarda Bazı Viral Etkenlerin Araştırılması

Hüseyin ALP

Veteriner Viroloji Anabilim Dalı

Tez danışmanı

Yrd. Doç.Dr. Sibel HASIRCIOĞLU

BURDUR – 2017

ÖZET

Viral Hemorajik Septisemi (VHS), İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis (İPN), İnfeksiyöz Hematopoetik Nekrozis (İHN) ve Epizootik Hematopoetik Nekrozis (EHN), Türkiye’de ve Dünya’da alabalıkların en önemli viral hastalıkları olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada, Doğu Karadeniz Bölgesindeki alabalık kuluçkahanelerinde ve yavru alabalıklarda VHS, İPN, İHN, EHN viruslarının varlığı araştırıldı. Bu amaçla, 2014-2016 yılları arasında Artvin, Rize, Trabzon, Giresun, Ordu, Gümüşhane ve Bayburt illerinde bulunan 20 alabalık çiftliğinde üretilen 3 farklı alabalık türünden (Gökkuşluğu alabalığı *Oncorhynchus mykiss*, Karadeniz alabalığı *Salmo trutta labrax* ve Kaynak alabalığı *Salvelinus fontinalis*) toplam 2100 adet balık örneği temin edildi. Toplanan balıklardan elde edilen doku örnekleri PZR/RT-PZR yöntemi ile bu viral ajanlar yönünden test edildiler. Bu moleküler tarama sonucunda, RZR/RT-PZR pozitif bulunan örneklerden BF-2 (Bluegill fry) ve EPC (Epithelioma papulosum cyprini) hücre kültürü hatlarına inokulasyon yapıldı. Çalışma sonucunda; örneklenen 20 alabalık işletmesinin hiçbirinde VHSV, İHNV, EHNV nükleik asidi tespit edilemezken, 10 işletmede İPNV genom varlığı belirlendi. İPNV nükleik asidi pozitif doku örneklerinin BF-2 ve EPC hücre kültürlerinde 2 kez pasajlanması sonucunda, ekilen bütün numunelerin hepsinden BF-2 hücre hatlarında İPN virusu izolasyonu gerçekleştirildi. Fakat, EPC hücre hatlarından sadece 5 adedinde etken izole edilebildi. Doğu Karadeniz bölgesinde yetiştiriciliği yapılan kültür alabalıklarında İPNV enfeksiyon varlığının ortaya konulduğu bu çalışmada, RT-PZR test sonuçları ile BF-2 hücre hattı izolasyon sonuçları arasında uyum olduğu belirlendi. Ayrıca İPNV izolasyon çalışmalarında, BF-2 hücre hattının EPC hattından daha duyarlı olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: EHNV, İHNV, İPNV, RT-PZR, VHSV.

**Republic of Turkey
Mehmet Akif Ersoy University
Institute of Health Science**

Master of Science Thesis

***Investigation of Some Viral Pathogens in Trout Hatcheries and Juveniles in Eastern
Black Sea Region***

**Name and Surname:
Hüseyin ALP**

Department of Virology

**Supervisor:
Assist.Prof.Dr. Sibel HASIRCIOĞLU**

BURDUR – 2017

ABSTRACT

Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS), Infectious Haematopoietic Necrosis (IHN), Infectious Pancreatic Necrosis (IPN), Epizootic Haematopoietic Necrosis (EHN) are accepted as a most important diseases of trouts both in the World and Turkey. In this study, the presence of VHS, IPN, IHN, EHN viruses in trout hatcheries and juveniles in Eastern Black Sea Region was investigated. For this purpose, between the years of 2014-2016, total of 2100 fish samples from 3 different fish species (Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*, Black Sea Trout *Salmo trutta labrax*, and Brook trout *Salvelinus fontinalis*) in 20 trout farms in Artvin, Rize, Trabzon, Giresun, Ordu, Gümüşhane and Bayburt provinces were obtained. Tissue samples from collected fish samples were tested by PCR/RT-PCR for this viral agents. Samples determined as positive by RT-PCR/PCR were inoculated into BF-2 (Bluegill fry) and EPC (Epithelioma papulosum cyprini) cell culture lines. As a result of this survey, IPNV was detected in 10 of 20 trout farms while the other viral agents were not detected in any of the farms. After tissue samples determined as positive by RT-PCR/PCR were passaged 2 times in BF-2 and EPC cell lines, IPN virus isolation was realized from all samples in BF-2 cell lines. But, IPN virus was isolated from only 5 samples in EPC cell line. In this study that IPNV infection in trout farms in Eastern Black Sea Region was revealed, it was detected to be harmonious between the results of RT-PCR test and cell culture isolation. However, The BF-2 cell line was found to be more susceptible than the EPC cell line.

Key Words: EHN, IPNV, IHN, RT-PCR, VHSV.

1. VİRAL HEMORAJİK SEPTİSEMİ VİRUSU (VHSV)

1.1. Giriş

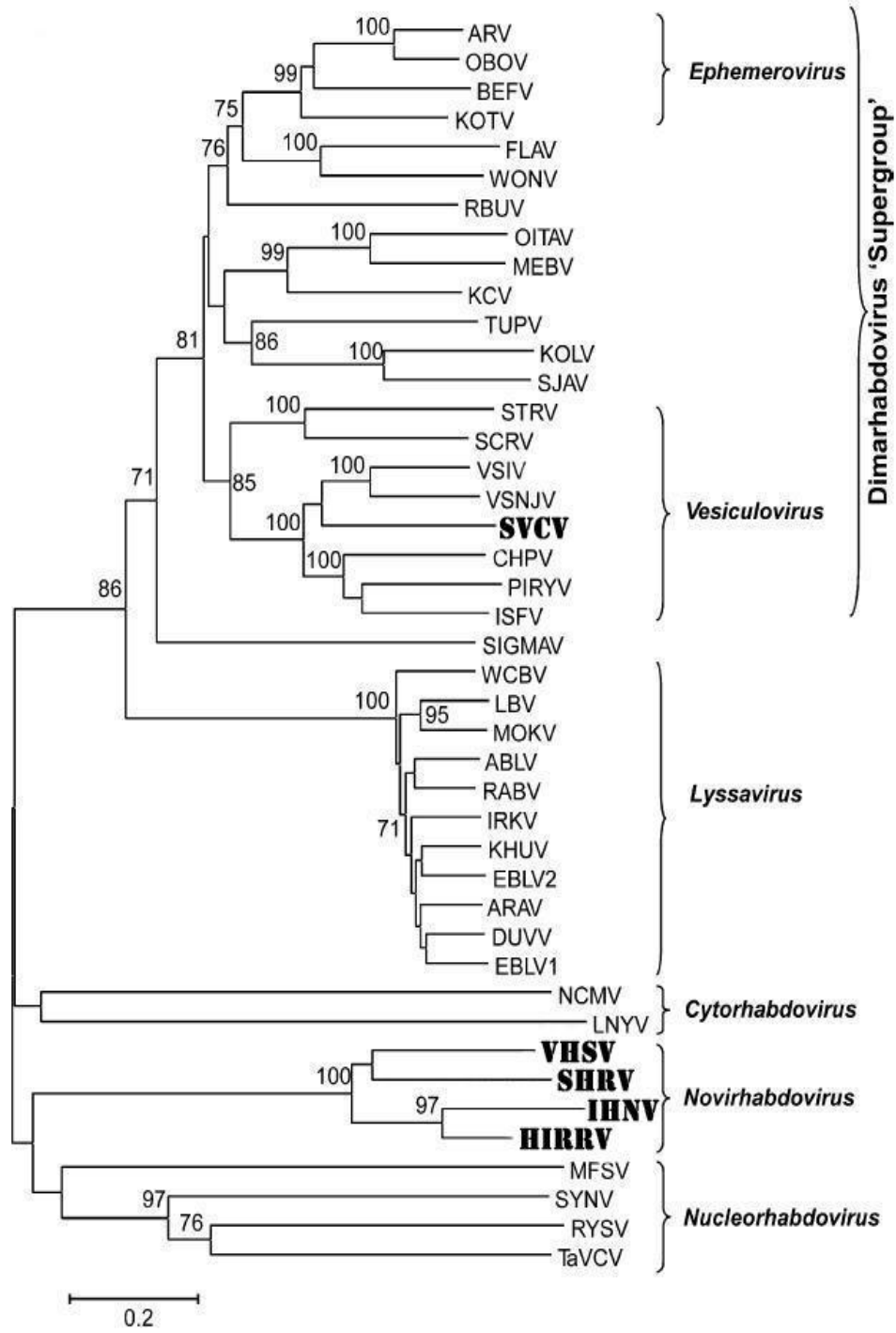
Viral hemorajik septisemi virusu (VHSV) balıklarda özellikle de alabalıklarda, hastalıklara ve önemli ekonomik kayıplara neden olan viral etkenlerin başında gelir. Büyüklüğe ve genetik faktörlere göre değişiklik gösteren VHS'nin mortalitesi yavru ve parmak boy balıklarda %80-100 oranına yükselebilmektedir. İki kg ve üstü balıklarda hastalık yavaş seyretmekle beraber mortalitenin %50'ye ulaşabildiği rapor edilmiştir (271).

1991 yılında yapılan bir çalışmaya göre viral hemorajik septisemi hastalığının (VHSH) Avrupa kültür balıkçılığına verdiği zarar yıllık yaklaşık olarak 40 milyon Pound olarak belirtilmiştir (326). Danimarka'da 2000 yılında meydana gelen VHS salgınında ise yıllık üretimi yaklaşık 165 ton olan iki gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmesinde mortalitenin %50'ye ulaştığı ve görülen maddi kaybın yaklaşık 211 bin Avro olduğu bildirilmiştir (326).

Viral hemorajik septisemi, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) tarafından ihbarı mecburi, izlenmesi gereken en tehlikeli viral balık hastalıkları arasında listelenmektedir (269). Türkiye'de ise Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın, 1 Nisan 2004 tarihli ve 2004/14 sayılı tebliğinde ihbarı mecburi hayvan hastalıkları arasında yer almaya başlamıştır (19).

1.2. Etiyoloji

Viral Hemorajik Septisemi Virusu (VHSV) *Rhabdoviridae* ailesinin *Novirhabdovirus* genusunda bulunur. Virion mermi şeklinde 180 nm uzunluğunda ve 70 nm çapında olup; negatif, tek iplikli, yaklaşık olarak 11000 nükleotid içeren RNA genomuna ve membran glikoproteini içeren bir zara sahiptir. VHSV genomu 3'-N-P-M-G-Nv-L-5' düzeninde kodlanmış altı proteinden oluşur ve bunlar; nükleoprotein (N), fosfoprotein (P), matrixprotein (M), glikoprotein (G), non-virion protein (Nv) ve RNA polimeraz (L)'dir (364). Enfekte hayvanlarda nötralizan antikorların oluşumuna neden olan protein virusun G proteindir (63, 319).



Şekil 1.1. *Rhabdoviridae* ailesine ait virusların N geni kısmi DNA dizi analizine göre neighbor-joining metoduyla yapılmış filogenetik ağacı. Koyu karakterle yazılmış olanlar balıklarda hastalık yapan virustlardır (191).

VHS virusunu tiplendirmede en ayırıcı metod nükleik asit sekansıdır. Yapılan sekans analizlerinin karşılaştırılması sonucunda genetik farklılıkların virusun izole edildiği coğrafi bölge ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir (326). Nükleoprotein (N), glikoprotein (G) ve non-virion (Nv) proteinin tam veya bölgesel sekans analizi sonucunda VHS virusunun dört genotipi olduğu bildirilmiştir (335). Bunlar;
Genotip I: Avrupa tatlı su izolatları, Karadeniz izolatları, Baltık denizi bölgesinin deniz izolatlarını içerir ve beş alt gruba ayrılır.

I-a) Avrupa tatlı su balıkları izolatları

I-b) Baltık denizi, Skagerrak, Kattegat, İngiliz kanalı ve Kuzey denizi izolatlarının bazıları

I-c) Danimarka tatlı su izolatlarının bazıları

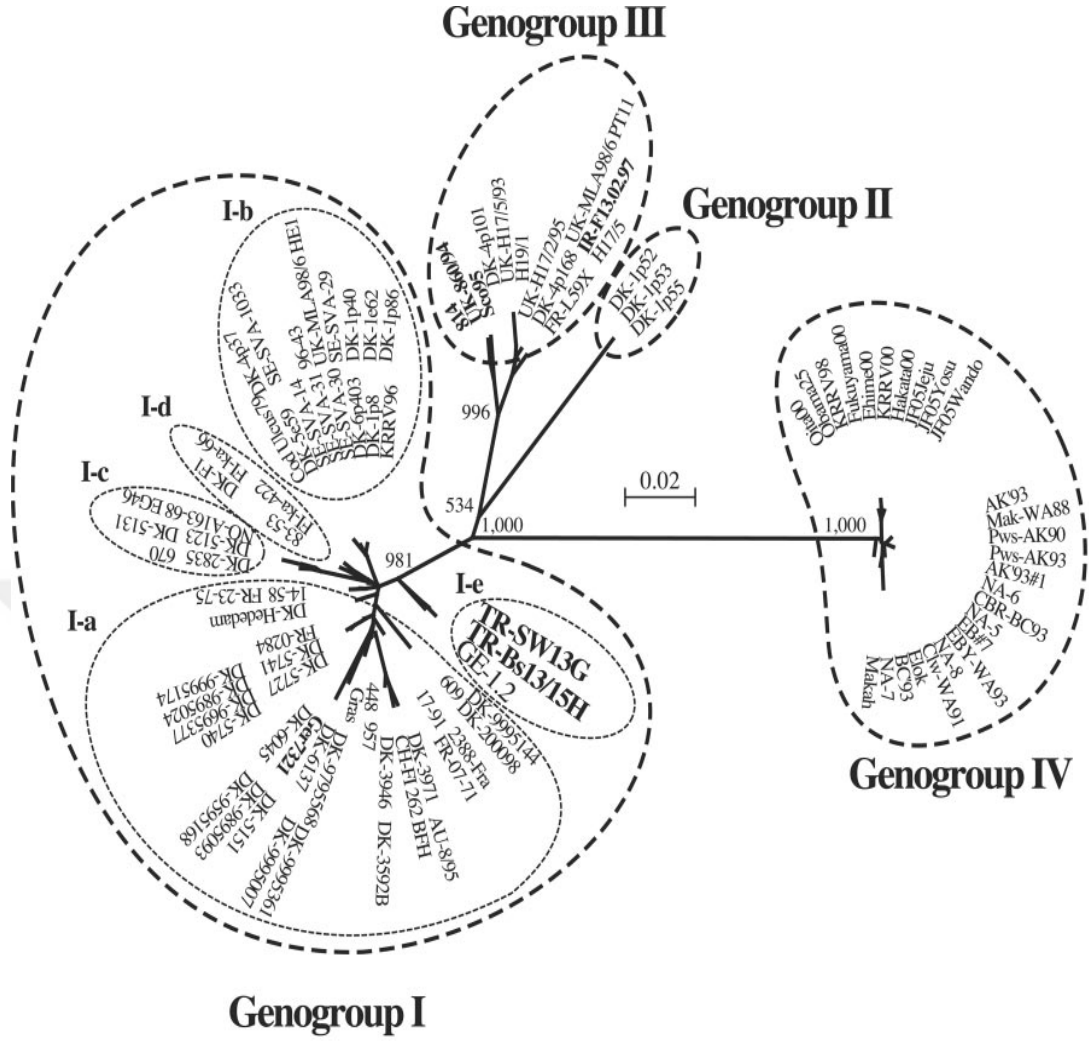
I-d) Norveç ve Finlandiya izolatları

I-e) Karadeniz izolatları

Genotipi II: Baltık denizinde Gotland havzası izolatları

Genotip III: Kuzey denizi izolatlarının bazıları (İngiltere ve İrlanda kıyı sularından ve Fransa'da yılan balıklarından elde edilen izolatlar)

Genotip IV: Kuzey Amerika ve Asya (Kore ve Japonya) izolatlarını içermektedir.



Şekil 1.2. Viral hemorajik septisemi virusunun kısmi G geni sekansına (nt 361'den 720'ye) göre şekillendirilmiş filogenetik ağacı (256).

1.3. Epidemiyoloji

VHSV'nun konakçı dışında hayatta kalışı içinde bulunduğu sıvı ortamın fizyokimyasal şartlarına ve sıcaklığa bağlıdır (4). Etken 4°C'de, 20°C'ye kıyasla daha uzun süre hayatta kalır. Virus 4°C'de tatlı suda 28-35 güne kadar hayatta kalabilir ve filtre edilmiş tatlı su da 4°C'de 1 yıl boyunca infektivitesini koruduğu görülmüştür (133, 283). Virus, ortama kan ve ovaryum sıvısı gibi organik materyal eklendikçe daha uzun süre hayatta kalır. Etken tatlı su da 15°C'de 13 günde inaktive olurken, deniz suyunda bu süre 4 gündür (133). VHS ile enfekte balıkları dondurup çözdürmek virüsü tamamen ortadan kaldırmamakta fakat %90 oranında inaktive ettiği bildirilmiştir (26).

Hastalık daha çok 4-14°C su sıcaklıklarında görülür. İnkubasyon süresi 7-15 gündür. Replikasyon için optimum su sıcaklığı 14–15°C ve optimum pH 7,4–7,8 dir (40, 79, 233). Hastalık yılın her mevsiminde gözlenmekle beraber salgınlar genellikle su sıcaklıklarında dalgalanmaların olduğu ilkbahar dönemlerinde daha çok görülür (1).

VHS virusuna karşı ergin balıklar genç balıklara göre daha dirençlidir. En duyarlı tür gökkuşağı alabalıdır. Çevre koşullarına bağlı olarak balık ölümleri %20'den %80'lere kadar çıkabilir, hatta alabalık larvalarında %100 ölümler de görülebilir (63).

Hastalığı geçirip hayatta kalan balıklar VHSV rezervuarlarını oluşturmaktadır (269). Hayatta kalan balıklar ömür boyu taşıyıcı hale gelerek üreme sıvısı ve idrar yoluyla virüsü çevreye saçarlar. Virus ikinci solungaç lamelleri ve vücuttaki yaralar vasıtasıyla balığa bulaşır. Yumurtlamadan 3–4 saat sonra yumurtalardan virus izole edilmesine rağmen bu virüsün yumurta ile vertikal bulaşması henüz kanıtlanamamıştır (80, 167).

Klinik belirtileri VHS'ye benzer ilk kayıt 1938 yılında Schaperclaus tarafından gökkuşağı alabalıklarında şişkin böbrek sendromu olarak bildirilmiştir (315). Pliszka 1946 da Güney Polonya' da benzer problemi tanımlamıştır (326). 1950'lerin başında hastalık Danimarka ve Fransa'da gözlenmiştir (294, 316). Jensen 1963 yılında alabalık hücrelerinden ilk izolasyonu yapmıştır ve izolatan örneklediği köye ithafen virüsü Egtved virus olarak adlandırmıştır (162, 163). VHS'nin Atlantic cod balığından (*Gadhus morhua*) ilk izolasyonu 1979'da güney Zelanda'da, mezigit balığından (*Melanogrammus aeglefinus*) ve morina balığından ilk izolasyonu 1993 ve 1995'de doğu İskoçya sularında yapılmıştır (164, 166, 170, 327, 328).

VHS 1988'de Amerika Birleşik Devletleri'nde chinook, *O. tshawytscha*, and coho salmon, *O. kisutch*, balıklarının ovaryum sıvılarından izole edilinceye kadar sadece Avrupa kıyılarında bildirilmiştir (53, 145).

Son 15 yılda VHS, Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Japonya, Kore ve Avrupayı içeren kuzey yarım küre boyunca 48'den fazla balık türünden izole edilmiştir (326).

1.4. Klinik Belirtiler

Akut VHS olgularında klinik belirtiler spesifik olmamakla beraber, deride, yüzgeç diplerinde, kaslarda ve iç organlarda peteşiyel kanamalar ve eksoftalmus olarak görülür. Nekropside asites görülür. Akut formda mortalite çok yüksektir; yavru balıklarda %100'e erişkinlerde ise %30-90'a ulaşabilir. Kronik formda enfekte balıklar herhangi bir klinik belirti veya patoloji göstermezler (35, 326). Bazı konakçılarda kronik infeksiyon dengesiz ve kararsız yüzme gibi sinirsel semptomlar ve solgun solungaçlar ile karakterizedir (179, 379).

1.5. Patoloji ve Bağışıklık

Akut enfekte balıklar havuzların veya tankların çıkışında kenarında ya da diplerinde toplanarak davranış değişikliği gösterirler. Balıklar genellikle anoreksik ve sonrasında letarjiktir (269). Mortalite klinik belirtiler görüldükten birkaç gün sonra başlar. Ölüm oranı balığın türüne, yaşına, çevresel koşullara ve virusun titresine göre değişir. Yavru balıklarda mortalite oranı duyarlı türlerde ve virulent şuşlarda %100'e kadar ulaşabilir (63).

VHSH'nda klinik semptomlar akut, kronik ve sinirsel olarak 3 gruba ayrılır (379). Hastalığın akut fazında görülen tipik patolojik lezyonlar multifokal external ve internal hemorajilerdir. Bu hemorajik lezyonlar ülserle dönüşerek daha çok göz çevresi ve yüzgeç diplerinde yaygınlaşırlar. İnternal hemorajiler iç organların seröz yüzeylerinde yaygın peteşi odakları olarak görülür (48). Kronik safhadaki hastalığın bilinen belirtisi akut fazda oluşabilen eksoftalmus ve karın boşluğunda oluşan asitestir (99, 180, 324). Deride koyulaşma kronik safhada balık türüne bağlı olarak görülür. Hastalığın sinirsel formunda hayatta kalan balıklarda anormal yüzme ve duruş bozukluklarıyla birlikte letarji gözlemlenir.

Hemoraji, eksoftalmus ve asites doğal ve deneysel enfeksiyonlarda balıklarda görülen yaygın lezyonlardır (99, 180, 326). Bununla birlikte kaya balıklarında (*Neogobius melanostomus*) renkte solgunluk yaygın bulgulardandır (128).

Gökkuşağı alabalıklarında VHSV genotip Ia ile yapılan histolojik çalışmalarda böbrek ve dalak gibi lenfopoetik ve hematopoetik dokularda multifokal nekrozlar ve değişen derecelerde vaskulitis histolojik lezyon olarak görülmüştür (109, 256, 379). Başka bir izolat olan VHSV 1b ile yapılan histolojik çalışmada ise histolojik lezyonlar karaciğer, kalp ve beyinde, hematopoetik dokulardan daha çok

görülmüştür (51, 109, 152). Ontario Gölü'nde yapılan araştırmalarda *Aplodinotus grunniens* türü balıkların kalbinde VHSV'ndan kaynaklı mikroskobik kalp nekrozları görülmüş ve bu lezyonların ölüme yol açtığı vurgulanmıştır. (225).

Karakteristik böbrek histolojik bulguları, hemorajilere eşlik eden multifokal dejenerasyon ve renal tubullerdeki nekrozlardır (51, 109, 183, 241, 334). Başka bir çalışmada interstitiumlarda nekroz ve fibrin birikimi bildirilmiştir (179). Dalakta fokal ve multifokal dejenerasyon ve nekroz gözlenmiştir (179, 183, 341). Doğal enfekte güneş balığında (*Pomoxis nigromaculatus*), karaciğerde hepatoselüler nekroz ve sinuslarda eritrosit birikimine rastlanmıştır (121, 341).

Hastalığın merkezi sinir sistemindeki bulguları beyin ve beyin zarlarında multifokal hemorajiler ve nöropillerdeki nekrotik odaklardır (74, 225, 324).

Hastalığa karşı duyarlılık balığın türüne, yaşına ve immun durumuna bağlı olarak değişmektedir (138, 139, 220). Yapılan çalışmalarda gökkuşağı alabalıklarının VHSV genotip Ia grubuna çok duyarlı, genotip 1b, IVa ve IVb gruplarına daha az duyarlı oldukları saptanmıştır (113, 147, 179, 376). Virusa karşı duyarlılıkta ortaya çıkan varyasyonun viral genotipin virulensinin farklılığıyla birlikte konakçıdan kaynaklandığı düşünülmektedir (95).

Beslenme koşulları, stok yoğunluğu, kötü çevre koşulları, su kalitesi ve diğer patojenler VHS salgınlarının ortaya çıkmasında rol oynayan stres faktörleridir (31, 102, 139, 174).

Balıklarda deri ve solungaçların viruslara karşı korunmada önemli rol oynadığı çeşitli çalışmalarda ifade edilmiştir (20, 44, 101). İnterferonun (İFN) balıklardada viruslara karşı doğuştan gelen immun faktörlerden olduğu bildirilmiştir (44, 101). Fiziksel bariyerden sonra tip1 İFN cevabı virusun replike olmasını kısıtlayıcı en önemli ajanlardan biridir (44, 101). VHSV ile enfekte veya genotip 1 den yapılan DNA aşılı enjekte edilmiş balıklarda İFN-1 benzeri genlerin ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (346). İFN varlığının Mx1, Mx2, Mx3, proteinlerinin üretimini indüklediği ve bu proteinlerin lokal bağışıklıkta rol oynadığı bildirilmiştir (75). Mx proteinlerinin üretimini birçok deneysel çalışmada kullanılan *polyinosinic-polycytidylic* asidin de (poly I:C, sentetik çift iplikli RNA) teşvik ettiği gösterilmiştir (343, 344, 346). Bu proteinlerin aynı zamanda deri ve solungaç gibi mukozal dokulardada varlığı saptanmıştır (245).

Makrofajlar virus replikasyonunun sınırlandırılmasında önemli rol oynarlar (340). Enfekte makrofaj tarafından üretilen İFN-1 diğer hücreleri enfekte olmaktan korurken, makrofajlar tarafından üretilen nitrik oksit (NO) gibi maddeler internal viral replikasyonu azaltır (340, 344, 346). Yapılan bir çalışmada VHSV ile enfekte kalkan balığı böbrek hücresi hattında NO üretimi görülmüş ve bunun viral replikasyonun azalması ile korelasyon gösterdiği saptanmıştır (345).

Deneysel çalışmalar balıkların yaşının enfeksiyona karşı duyarlılığı etkilediğini göstermiştir. Örneğin, Pasifik ringa balığının yavrularını öldüren VHSV IVb genotipinin aynı balığın ergin bireylerinde çok az enfeksiyona yol açmıştır (139). Araştırmacılar yaşla birlikte virusa karşı görülen bağışıklığın arttığını belirtmişlerdir. Gökkuşuğu alabalıklarında genotip 1a ile yapılan deneysel bir enfeksiyonda 3 gr kadar olanlarda ölüm oranının %100 e ulaştığı, 3 gramdan büyüklerde ise mortalitenin %10-15 arasında seyrettiği bildirilmiştir (332).

Teleost balıklarda doğal enfeksiyon veya immunizasyon ile bağışıklık elde edilebilmiştir (220, 222). Kahverengi alabalıklarda düşük virulensli VHSV suşunun enfeksiyona karşı yeterli bir bağışıklık sağladığı belirtilmiştir (106).

VHSV'nun G proteininin enfekte balıklarda viral titreyi azaltan nötralizan antikorların oluşumuna sebep olduğu tespit edilmiştir (220, 222). Yapılan deneysel çalışmalarda VHSV'na maruz bırakıldıktan 8 gün sonra nötrlizan antikorlara rastlanmıştır (273). Nötralizan antikorların gelişmesi sıcaklığa ve viral proliferasyon süresine bağlı olarak değişmektedir. Daha yüksek antikor titresi 5-10°C de görülmektedir (362).

1.6. Teşhis

Ani ölümler, letarji, deri renginin koyulaşması, eksoftalmus, anemi, yüzgeç diplerinde, solungaçlarda, deride ve gözlerde hemoraji, anormal yüzme, karın boşluğunda asites ve ödem hastalığı akla getirirse de diğer hastalıklarda da benzer bulgular görüldüğünden klinik belirtiler teşhiste tek başına yeterli değildir (269).

Patolojik görünüm, deri, kaslar ve iç organlarda peteşiyel hemorajileri içerir. Dorsal kaslardaki peteşiyel kanamalar VHS olgularında yaygın belirtilerdir. Böbrek koyu kırmızı ve dalak şişmiş vaziyettedir. Karaciğer ve gastrointestinal kanal solgun ve bağırsaklar besin maddesi ile doludur (269).

Hastalığın akut fazında kırmızı kan hücreleri azalmıştır ve kan parlak kırmızı şeffaf görünümündedir.

Mikro patolojide immuno-histokimyasal incelemelerde vasküler sistemde VHSV pozitif endotelial hücreler görülmüştür (109). Böbrek, karaciğer ve dalakta nekroz odakları, sitoplazmik vakuol, karyolizis, piknozis, lenfositik invazyon gibi dejenarasyonlar bildirilmiştir.

Etken elektron mikroskopunda 60-70 nm çapında ve 180-240 nm uzunluğunda tipik mermi şeklinde görülür (269).

VHSV için standart sürveyans metodu direkt metodlara dayanır. Balık dokusunun hücre hatlarında inokulasyonunu takiben uygulanan İFAT, ELİSA, RT-PZR teknikleri direkt yöntemlerdir. VHSV antijeni için uygulanan direkt immunolojik yöntemler düşük sensitiviteye sahiptir. Antijen-antikor ilişkisine bağlı bu metodlar sadece klinik, epidemiyolojik ve histokimyasal belirtiler gösteren balıklarda kullanılabilir. Yapılan yayınlar RT-PZR'nun dokulardan VHSV'nu teşhis etmede yüksek hassasiyete sahip olduğunu göstermiştir (120, 166).

VHSV izolasyonu için yaygın olarak, BF-2 (bluegill fry), RTG-2 (rainbow trout gonad), EPC (Epithelioma Populosum Cyprini), FHM (Fathead Minnow), CHSE-214 (Chinook Salmon Embryo) hücre kültürleri kullanılmıştır (379).

Enfekte balıklarda antikorlar, ELİSA, İFAT, plak nötralizasyon ve Western blot analizi ile teşhis edilebilir (118, 272).

Etkenin teşhisinde RT-PZR yaygın şekilde kullanılmakta ve OİE tarafından tavsiye edilmektedir (269). Kantitative RT-PZR, VHSV'nun tüm genotipleri için geliştirilmiş olup yüksek sensitivitesi, hızlılığı ve verimliliğinden dolayı araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (120, 144, 231). PZR tekniklerinde ölü ve canlı virus ayrımı yapılamadığı için, virus izolasyonu ile PZR birlikte kullanılır (269). İnoküle edilmiş hücre kültürlerinde viral antijenin tespiti İndirek Florasan Antikor tekniği (İFAT), İmmun Peroksidaz (İP) boyama yöntemleriyle yapılabilir.

1.7. Koruma ve Kontrol

Yüzey sularından kaçınmak gibi sıkı biyogüvenlik önlemlerinin alınması hastalığa karşı korunmada önemlidir. İşletmeye giren suyun ultraviyole sistemi ile inaktive edilmesi etkili olabilir fakat pahalı ve uygulama alanı kısıtlı bir yöntemdir (146, 279).

Hastalığa dirençli türlerin yetiştiricilik için seçilmesi tartışmalı olmasına rağmen uygulanabilir bir metottur. 1980'lerin ortalarında VHSV'na dirençli gökkuşuğu alabalığı yetiştirmek için bir program başlatılmıştır (66). Bu program deneysel yöntemle hastalığa dirençli hale getirilen ergin dişi ve erkek bireylerin seçilmesine dayanmaktadır. Hastalığa dirençli bireylerden elde edilen yavruların birinci generasyonu ile üçüncü generasyonu karşılaştırıldığında VHSV'na karşı direnç önemli ölçüde artmıştır (95).

Danimarka'da VHSV'nun yayılmasını kontrol altına almak için sanitasyon programları 1960'lı yıllarda uygulanmaya başlanmıştır. Uygulanan program başlıca üç aşamadan oluşmuştur; kuru bekletme, dezenfeksiyon ve yeniden stoklama (127, 326). Su sıcaklığı yükseldiğinde öncelikle havuzlardaki balıklar imha edilmiş bunu kuruda bekletme ve dezenfeksiyon takip etmiştir. Kafes sistemleri bulunduğu nehir veya gölün dışına çıkarılarak dezenfekte edilmiştir. Kurutulan havuzlar sönmemiş kireç ile, çiftlikteki tüm alet ve ekipman formalin veya iyodin kullanılarak temizlenmiştir. İmha edilen balıkların yerine konulan yeni balıklar virus-free sertifikalı popülasyonlardan seçilmiştir. Uygulanan bu yöntem sayesinde Danimarka'da VHSV ile enfekte işletme sayısı 27 yılda 500'den 26'ya düşmüştür (127, 326).

Günümüze kadar, canlı, ölü, rekombinant aşı ve DNA aşısı olmak üzere dört tip aşı VHSV için geliştirilip denenmiştir (56, 78, 206). Geniş çaplı araştırmalar yapılmasına ve deneysel aşı çalışmalarının etkinliğinin gösterilmesine rağmen VHSV için henüz ulaşılabilir ticari aşı yoktur (222). Gökkuşuğu alabalıklarında değişen ölçülerde koruyucu etkisi olan canlı-atenüe bir aşı geliştirilmiştir, fakat canlı aşılar onay verilmemektedir (79, 77, 168, 332). VHSV'nun rekombinant G proteini ile yapılan aşılar sadece intraperitoneal (i.p.) enjeksiyon yoluyla kullanıldığında koruma sağlamıştır (206, 224). Oral aşılar ile göreceli bir bağışıklık ve değişen ölçülerde antikor elde edilmiştir (2).

VHSV'na karşı geliştirilen DNA aşıları yapılan deneysel çalışmalarda yüksek bağışıklık sağlamıştır (73). DNA aşıları için VHSV'nun G ve N genleri kullanılmakta ve iki gen de koruyucu bağışıklığı teşvik etmektedir (73, 206, 221).

Tablo 1.1. Çeşitli dezenfektanların VHSV üzerine virusidal etkileri (188).

Dezenfektan	En düşük etkili doz	En düşük etkili süre
Ethanol	%40	2 dakika
1-propanol	%20	2 dakika
Fenol	%2,5	5 dakika
Sodyum hipoklorit	100 ppm	5 dakika
Sönmemiş kireç	50 ppm	60 dakika
İyodin	50 ppm	1 dakika
Benzalkonyum klorür	1/1000 dilüsyon	5 dakika

2. İNFEKSİYÖZ PANKREATİK NEKROZİS VİRUSU (İPNV)

2.1. Giriş

İnfeksiyöz pankreatik nekrozis (İPN) balıkların özellikle de yavru ve genç salmonidlerin akut, bulaşıcı ve sistemik viral hastalıklarından biridir. Hastalık yaygın ve mortalite yaşa göre değişmektedir. Yavru ve parmak boy balıklarda ölüm oranı ergin balıklara göre daha yüksektir.

Hastalığın verdiği ekonomik zarar, 2001 de İngiltere’de yapılan bir saha çalışmasına göre yıllık 2 milyon pounddur. Norveç’te 1991-2002 yılları arasında yürütülen araştırmalara göre somon balıklarında direkt İPN’den post-smolt ölümlerin total sayıya oranı %4,5-12 olarak bulunmuş ve bunun senelere göre 5-10 milyon avro kayba neden olduğu belirtilmiştir (157, 158, 211).

İPN Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OİE) tarafından ihbarı mecburi, izlenmesi gereken en tehlikeli viral balık hastalıkları arasında listelenmekteyken hastalığın yaygınlaşması sonucu bu statüden çıkarılmıştır (262, 263). Türkiye’de ise Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı’nın, 12 Temmuz 2007 tarihli ve 2007/32 sayılı tebliğinde ihbarı mecburi hayvan hastalıkları arasından çıkarılmıştır (19).

2.2. Etiyoloji

İnfeksiyöz pankreatik nekrozis virusu, infeksiyöz pankreatik nekrozis hastalığının etiyolojik ajanı olup, *Birnaviridae* ailesinin *Aquabirnavirus* genusunda yer alan çift segmentli bir RNA virusudur (209, 149). *Birnaviridae* ailesi *Aquabirnavirus*, *Avibirnavirus*, *Blosnavirus* ve *Entomobirnavirus* olmak üzere 4 genusdan oluşmaktadır (84). *Aquabirnavirus* genusu akuatik türleri infekte eder ve İPNV, Yellowtail ascites virus ve Tellina virus olmak üzere 3 türden oluşmaktadır.

İPNV segment A ve segment B olmak üzere iki segmentli çift iplikli bir RNA’ya sahiptir (209). Segment A yaklaşık olarak 3100 nükleotid içerir ve iki açık okuma çerçevesinden oluşur (ORF). Birinci ORF bölgesi 106 kDa poliprotein kodlar ve NH₂-pVP2-VP4- VP3-COOH dizilimine sahiptir. İkinci ORF bölgesi ise VP5 proteinini kodlamaktadır (285). Segment B 2900 nükleotid den oluşur ve VP1 proteinini kodlamaktadır. VP1 proteininin moleküler kütlesi 94 kDa olup viral replikasyondan sorumludur (59, 209, 125). VP2 major kapsid proteini olup birçok antijenik bileşenler içerir ve aynı zamanda yapısal fonksiyonlara sahiptir (71). VP3

minor kapsid proteinidir ve bazı antijenik epitoplari içerir (30, 209). VP4 viral proteaz ve VP5 anti-apoptozis proteindir (111, 207, 227, 313, 314). Virion zarsiz ikozahedral yapida 60 nm çapındadır (84).

İPNV yüzey epitoplarına karşı gelişen nötralizan antikorlara göre A ve B olmak üzere iki serogruba ve yapılan genetik analize göre 6 genogruba ayrılmaktadır (9, 42, 142, 274, 296, 358). Serogrup A dokuz serotip içerirken (A1-A9), serogrup B sadece bir adet virulent serotip içermektedir (142). Genel olarak, serotip A1 Kuzey Amerika, A2-A5 Avrupa, A6-A9 Kanada suşlarından oluşmaktadır. Asya ve Güney Amerika suşları A1-A3 serotiplerine girmektedir (108, 276). Norveç ve İskoçya'da Atlantik somonundan elde edilen suşlar ise A2 serotipi içerisinde yer almaktadır (184, 240, 329).

Tablo 2.1. İPNV suşlarının serum nötralizasyon testine göre serotiplendirilmesi ve genetik analize göre genogruplara ayrılması (42, 142).

Serotip	Orijin	Tarihsel isimlendirme	Genogrup
A ₁	Kuzey Amerika	WB	1
A ₂	Danimarka	Sp	5
A ₃	Danimarka	Ab	2
A ₄	İngiltere	He	6
A ₅	Almanya	Te	3
A ₆	Kanada	Can. 1	3
A ₇	Kanada	Can. 2	4
A ₈	Kanada	Can. 3	4
A ₉	Kanada	Ja	1
B ₁	İngiltere	TV-1	

2.3. Epidemiyoloji

Hastalığa benzer bulgular, ilk defa 1940 yılında kaynak alabalıklarında (*Salvelinus fontinalis*) akut kataral enteritis olarak rapor edilmiştir ve çoğu zaman sadece kuluçhanelerde yetiştirilen yavru balıkları etkilediği düşünülmüştür (238). Doğu Amerika kıyılarında parmak boy kaynak alabalığı ve gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) meydana gelen salgınlar hastalığın ilk yemlemeyi müteakiben başladığını göstermiştir. Etkenin ilk izolasyonu 1957 yılında yapılmıştır (333, 382). İPNV ile enfekte yavru bireylerde mortalitenin %90'ların üzerine çıktığı rapor edilmiştir (363).

Doğu ve batı kuzey Atlantik kıyılarında yapılan çalışmalar, enfeksiyonun yabani özellikle de yassı balık türlerinde yaygın olduğunu göstermiştir (301, 325). Danimarka'da yapılan araştırmalar sonucunda ise Kuzey Denizi, Skargerrak ve Kattegat denizlerinden 45 izolat elde edilmiş ve bunların serogrub B' de yer aldıkları belirtilmiştir (325).

Yapılan çalışmalar Japonya ve Kore kıyılarını İPNV için ikinci sıcak bölge olarak göstermiş, bu bölgede deniz balıklarından birçok izolat elde edilmiştir (190). 2004 yılında yapılan bir çalışmada Japonya'nın Kawaga vilayetinde kültürü yapılan sarıkuyruk balığı (*Seriola quinqueradiata*), akya balığı (*S. dumerili*), pisi balığı (*Paralichthys olivaceus*), benekli pisi balığı (*Verasper variegatus*) gibi deniz türlerinde etkenin varlığı rapor edilmiştir (151). İPNV Kore'de kültürü yapılan pisi balıkları, kaya balığı (*Sebastes schlegeli*) ve Japon pisi balığından izole edilmiştir (171, 320, 336).

İPNV ayrıca Yeni Zelanda'da kral somon balıklarında (*O. tshawytscha*), Tazmania'da denizde kültürü yapılan salmonidlerde izole edilmiştir (351). Etkenin Türkiye'de, Yunanistan'da ve Meksika'da varlığı 2002 yılında bildirilmiştir (60, 276, 360). İPN Rusya'nın Murmansk bölgesinde Atlantik somon balıklarında 2003 yılında belirlenmiştir (289). Yapılan survey çalışmalarına göre İsveç salmonid yetiştiriciliğinde bu hastalık görülmemiştir (23).

Etken, asit, eter, kloroform, gliserole ve göreceli olarak da sıcaklığa dayanıklıdır. İPNV'nun + 4°C'de 4 ay boyunca canlı kaldığı ve uzun süreli muhafaza için en az -20°C'de saklanması gerektiği, etkenin %0-40 aralığında tuzluluk oranına dayanıklı olduğu ve yağsız süt, laktoz, laktoalbumin hidrolizati

varlığında kolayca liyofilize olduğu belirtilmiştir (246). Etkenin enfektivitesinin filtre edilmiş dekontemine sularda + 4°C'de 5-6 aya kadar devam ettiği bildirilmiştir (36). Çeşme sularında 10°C'de etkenin varlığının 7. aya kadar devam ettiği fakat hiç işlem görmemiş sularda virusun 14. günden sonra tespit edilemediği rapor edilmiştir (5). Tatlı su ve deniz suyunda 17 günde etkenin gözle görülür biçimde azaldığı görülmüştür. Enfektivitenin steril nehir ağzı suyunda doğal kirli sulara göre 4 kat daha fazla uzun sürdüğü belirtilmiştir (33, 352, 353). Virus kurutulmaya (4 hafta), radyasyona (10⁶ rad doz) ve UV ışınlarına (5 dakika 254 nm) oldukça dirençlidir (5, 279). İPNV klorin, iyodin, ozon, formalin gibi dezenfektanlara duyarlıdır. Birçok balık virusu ısıya duyarlı iken İPNV ısıya dayanıklıdır. 60°C'de termal inaktivasyon süresinin pH 3 değerinde 30 dakika sürdüğü, pH 9'da ise enfeksiyonun saatlerce devam ettiği ifade edilmiştir (85).

İPNV rutin olarak BF-2 (bluegill fry), CHSE-214 (chinook salmon embryo), EPC (epithelioma papulosum cyprini), RTG-2 (rainbow trout gonad), and SAF-1 (sea bream fins) hücrelerinde çoğaltılmaktadır. (3, 38, 378). Optimum üreme ısısı 20-24°C'dir (88). İPNV izolasyon çalışmalarında en iyi sonuçlar BF-2 ve CHSE-214 hücre hatlarından elde edilmiştir (219).

Kaynak alabalığı ve gökkuşağı alabalığı hastalığa en duyarlı türler olup, Atlantik somonu salmonidler arasında en dirençli türler arasında yer almaktadır (287, 306). Konakçının yaşı hastalığın virulensine etki eden en önemli faktörlerdendir. Mortalite oranı genç balıklarda daha yüksektir (381).

Kaynak alabalığında yapılan bir deneysel çalışmada total mortalite 1 aylık balıklarda %85, iki aylıklarda %73, dört aylıklarda %45 görülürken, 6 aydan büyüklerde dikkate değer bir ölüm oluşturmamıştır (117). Gökkuşağı alabalıklarında yapılan benzer bir çalışmada ölüm oranı, iki haftalık enfekte balıklarda %70 oranında görülürken, 20 haftalık balıklarda ölüm oranı düşük değerlerde seyretmiştir (96). Altı aydan büyük yaştaki balıklar enfeksiyona karşı dirençli olup, asemptomatik olarak etkenin taşıyıcısıdır. Taşıyıcı balıklar etkeni feçes ve reproduktif sıvıları ile diğer bireylere bulaştırırlar (122, 380). Vertikal bulaşma şekli de birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (234, 249).

Su sıcaklığı etken için önemli bir faktördür. Kaynak alabalıklarında yapılan deneysel bir çalışmada İPNV ile enfekte yavru balıklarda ölüm oranı 10°C'de %74,

15,5°C'de %46 olarak görülürken 4,5°C'de hiç ölüm gözlenmemiştir (117). Gökkuşluğu alabalığı yavrularıyla yapılan başka bir çalışmada mortalite 6°C'de, 10°C'ye oranla çok daha az görülmüş ve 16°C'de baskılanmıştır (96).

2.4. Klinik Belirtiler

İPN hastalığının spesifik bir klinik belirtisi yoktur. Davranışsal değişiklikler, hasta bireylerdeki iç ve dış makroskobik ve mikroskobik bulgular hastalığın teşhisinde fikir edinmeyi sağlar. Salmonid yavrularında dönerek yüzme, anoreksi ve havuzun veya kafesin kenarında yüzme gibi anormal belirtiler rapor edilmiştir (382). Enfekte bireylerde deride kararma, eksoftalmus, karında şişkinlik, solungaçlarda solgun görünüm, ventral yüzgeç diplerinde peteşiyel hemorajiler enfeksiyonun patognomik olmayan klinik belirtileridir ve enfekte balıkların birçoğunun anal boşluğundan ince beyazımsı-sarımsı bir akıntı geldiği gözlemlenmektedir. Sindirim kanalı, genellikle boştur ve süte benzer mukoz bir içerikle kaplıdır ve visseral asites ile hemoraji mevcuttur. Bazı bireylerde karaciğer, kalp, böbrek ve dalak anormal şekilde solgun bulunmaktadır (378).

İnkubasyon periyodu kaynak alabalığı ve gökkuşluğu alabalığı yavrularında 4-7 gün, Atlantik somonu yavrularında 10-14 gün olarak belirtilmiştir (270, 348, 367).

Enfeksiyonun Atlantik somonunun post-smoltlarında, iştah kaybı, artan ölümler, atipik yüzme, boş sindirim kanalı, bağırsaklarda kataral visköz bir eksudat ve solgun sarı bir karaciğer ile karakterize olduğu saptanmıştır (299). Pilorik yağ dokuda peteşiyel hemorajiler görülebilir. Hastalığı atlatan balıklar genellikle kaşektik ve depresiftir (330). Enfeksiyonun Atlantik somonlarının post-smoltlarındaki inkubasyon süresi 10°C'de, 10-14 gün olarak bildirilmiştir (49, 293).

2.5. Patoloji ve Bağışıklık

Sindirim kanalı ve barsak lümenlerinin boş ve beyazımsı yapışkan bir sıvı ile dolu olduğu, bazı enfekte balıklarda pilorik sekanın yağ dokusunda peteşiyel odakların bulunduğu, karın boşluğunda asites görüldüğü, dalak, kalp, karaciğer ve böbreklerin anormal olarak büyümüş olup solgun görüldüğü ve tüm iç organlarda peteşiyel hemorajilerin saptandığı, hastalığın makro patolojik bulguları olarak rapor edilmiştir (117).

İPN hastalığı salmonidlerde, birçok histopatolojik değişikliklere neden olmaktadır. Enfekte balıkların pankreas asiner hücrelerinde şiddetli ve büyük nekroz odakları ile birlikte hücre çekirdeklerinde piknosis, karyoreksis ve bazofilik sitoplazmik inkluzyon cisimcikleri gözlenmiştir (331, 348). Renal boşaltım ve hematopoetik dokular, glomeruluslardaki konjesyon ile hemorajiden ve tubul epitellerindeki ödem ve tahribattan etkilenmiştir (310, 311). Pilonus, pilorik sekada nekroz odakları ve bağırsakların ön kısmının mukozasında akut enteritis ve bağırsak epiteline dökülmeler gözlenmiştir (239, 331).

İPN ile enfekte gökkuşacağı alabalığı ve Atlantik somonlarının karaciğer dokularında konjesyon, nekroz odakları ile birlikte parankima hücrelerinde fokal dejenarasyonlar gözlemlenmiştir (310, 342, 348). Hepatositlerde virionların varlığı saptanmıştır (185). İPN virusunun varlığı pankreatik ve böbrek dokularının en küçük yapıtaşlarında bile görülmüştür (213, 383). Enfekte hücrelerin sitoplazmasında zar ile çevrili kristalize formda viral kümeleşmeler rapor edilmiştir. Enfekte balıkların dokularında viral titre genellikle yüksek olup 10^7 - 10^{10} /gr doku kültürü enfektif doz civarında olduğu belirtilmiştir (61).

Persiste enfekte Atlantik somonlarının ön böbrek lökositleri (ÖBL) ile yapılan in vitro bir çalışmada, adı geçen lökositlerin kontrol grubuna göre İPNV'na karşı zayıf bir proliferatif immun cevap verdikleri görülmüştür (181). Gökkuşacağı alabalıklarında *nylon wool-adherent* yöntemi ile yapılan benzer bir çalışmada immunglobulinlerin pozitif olduğu bölgede mitojenik cevabın daha kuvvetli olduğu belirtilmiştir (349). *Plastik-adherent* metodu kullanılan ve enfekte somonlarda yapılan başka bir çalışmada ÖBL'nin respiratuvar bursal aktivitesinde belirgin bir azalma rapor edilmiştir (165).

İPNV ile enfekte gökkuşacağı alabalıklarında kan lökosit hücrelerinin fagositik öldürme ve miyeloperoksidaz kapasitelerinde ve ÖBL'nin respiratuvar bursal aktivitelerinde azalma gözlemlenmiştir (322). Atlantik Salmonlarında yapılan deneysel bir çalışmada ÖBL'inde, nötrofillerin azaldığı ve B lenfositlerin sayısının değişmediği görülmüştür (302). Hastalığın gökkuşacağı alabalıklarında ÖBL'nin fagositik aktivitesini ve plazmadaki komplement mekanizmasını etkilediği görülmemiştir (57).

İnterferonun çeşitli balık hücrelerinde Mx protein ekspresyonunu tetikleyerek non-spesifik bir bağışıklık sağladığı bilinmektedir (28). Yapılan araştırmalarda İPNV enfeksiyonunun Atlantik somonlarının post-smoltlarında Mx gen ekspresyonunu hızlı ve sürekli olarak indüklediği tespit edilirken, periste enfekte yetişkinlerde benzer bulgu tespit edilememiştir (216). Mx gen ekspresyonunun, *poli inosinik; poli sitidilik asit* (poly I:C) ile de teşvik edildiği gösterilmiştir. Mx indüksiyonu, enfekte Atlantik somonlarının post-smoltlarının karaciğer dokularında, sağlıklı ve düşük viral titreye sahip parmak boy bireylere göre daha yüksek seviyede olduğu saptanmıştır (217). Senegal dil balıklarında yapılan deneysel enfeksiyon çalışmasında, Mx transkripsiyonunun poly I:C ile tetiklendiğinde, İPNV replikasyonunun azaldığı görülmüştür (112). İmmuno histokimyasal yöntemlerle enfekte post-smoltların, karaciğer, böbrek ve solungaç dokularında Mx protein varlığı belirlenmiş, bunun yüksek düzeyde interferon ve Mx geni transkripsiyonuna delil olduğu ifade edilmiştir (76). Atlantik somonlarında yapılan deneysel enfeksiyonlarda çeşitli dokulardaki immün genlerin miktarı ölçülmüş, intraperitoneal (i.p.) injeksiyon yoluyla enfekte balıkların böbrek dokularındaki Mx, İFN-1, İFN-2 ve gama interferon indükleyici proteinin (γ IP) enfeksiyondan 6 gün sonra arttığı gözlemlenmiştir (237).

2.6. Teşhis

İPN hastalığı için etkili aşı ve antiviral ilaç bulunmadığı için hastalığın teşhisinde hızlı ve duyarlı metodların kullanılması hastalığın yayılımı ve salgınların önlenmesinde en uygun yaklaşımdır.

Etkenin teşhisinde, doku kültürü izolasyonunu, nötralizasyon testi, ELİSA, İFAT/FAT, flow sitometri, immunohistokimyasal yöntemler, ve PZR metotları kullanılmaktadır. Doku kültürü izolasyonu birçok viroloji laboratuvarında kullanılan bir yöntemdir. Bu maliyetli ve zaman alıcı bir yöntem olup, bu yöntemin etkinliği kullanılan hücrenin duyarlılığına bağlıdır (235). Nötralizasyon testi spesifik, duyarlı ve kolay okunabilir referans teknik olarak bilinmesine rağmen; hızlı sonuç veren bir teknik olmaması, kullanılan monoklonal antikor gruplarının yetersizliği ve kullanılan viral titrenin standardize edilmesindeki zorluklar gibi dezavantajlara sahiptir (8, 175, 212, 255). FAT/İFAT geleneksel yöntemlere göre hızlı, duyarlı ve spesifik tekniklerdir. Fakat bu tekniklerin de hatalı boyama ve kalifiye eleman ihtiyacı gibi birtakım dezavantajları bulunmaktadır (300). Son zamanlarda İPNV'nun teşhisi için

hassas, hızlı ve tek aşamalı RT-LAMP (*reverse transcription loop-mediated isothermal amplification*) yöntemi geliştirilmiştir. Bu yeni yöntemin Real Time PZR'dan daha hassas olduğu gösterilmiştir (337).

Birçok araştırmacı RT-PZR testinin hızlı, duyarlı, güvenilir ve elverişli bir metod olduğunu göstermiştir (258, 300, 366, 374). Yapılan bir çalışmada RT-PZR testi İPNV'nun teşhisi için optimize edilmiştir. Optimize edilen yöntem kullanılarak A serogrubundaki tüm etkenler 10 enfeksiyöz ünite/g böbrek dokusu kullanılarak identifiye edilmiştir (176, 347). RT-PZR testinin duyarlılığı, İPNV'nun teşhisinde kullanılan örnek miktarları (10 fg-15 pg'a kadar) düşürülerek ölçülmüştür (218, 297, 366). PZR tekniği hücre kültürü izolasyonu için yetersiz miktarda olan örnekte bile virüsü tespit edebilmektedir (89). Bundan dolayı yöntemin, kontaminasyon, aşılama ve non-enfektif viral nükleik asit varlığında yanlış pozitif reaksiyon verebileceği belirtilmiştir (11, 210).

2.7. Koruma ve kontrol

Hastalıktan korunmada ilk aşama hayvan sağlığı için gerekli önlemleri almaktır. Bu aşamadaki temel amaç alınan önlemlerle vertikal ve horizontal bulaşmayı önlemektir. Hastalıklı bireylerin ayrılması bu bireylerin ve bulunduğu yerlerin dezenfekte ve dekontamine edilmesi, periyodik olarak tarama çalışmalarının yapılması, balık hareketlerinin ulusal ve uluslararası kurallar ile düzenlenmesi hayvan sağlığı önlemlerinin bir parçasıdır (317).

Virus in vitro koşullarda iodoform, klor, etanol, metanol ve halosiyamine duyarlı olup, quaterner amonyum bileşiklerine, propanol ve fenol'e dirençlidir (15, 29, 91, 94, 110, 150).

İPNV salgınından korunmak için çiftlikte kullanılan tüm alet ekipman periyodik olarak dezenfekte edilmelidir. Kuluçkahaneye ve çiftliğe giren su UV, ozon ve klor ile temizlenmelidir. Su kaynağının etkenden dekontemine edilmesi için 246 mJ/cm² doz gibi yüksek dozda UV gerekmektedir (214). Bununla birlikte etkenin 0.1–0.2 mg/litre ozona 60 saniye maruz bırakıldığında %99 oranında inaktive olduğu bildirilmiştir (279). Akuakültür üretim sistemlerinde popülasyon yoğunluğu değiştirilerek ölüm oranını kontrol edilebileceği belirtilmiştir (202, 288). Popülasyon yoğunluğunun azaltılmasının, kuluçkahanede yetiştirilen alabalıkların İPNV salgınında ölüm oranının azalmasını sağladığı görülmüştür (169).

Genetik olarak hastalığa dirençli hayvanların yetiştirilmesi hastalıktan korunma yöntemlerinden biridir. Gökkuşacağı alabalıklarında yapılan bir çalışmada balıkların soyağacı çıkarılmış QTL (*Quantitative Trait Loci*) 'ye göre hastalığa dirençli olanlar seçilmiş ve bunlardan melezleme ile elde edilen İPNV'na dirençli bireyler üretilmiştir (270, 280).

Hastalığa karşı korunma da diğer bir yöntem aşılama çalışmalarıdır. İnaktive virus ile aşılama gökkuşacağı alabalıklarında, oral, immersiyon ve enjeksiyon yoluyla yapılmış ve sadece enjeksiyon yoluyla aşılama korunma sağlanmıştır (90, 141). Bununla birlikte çok sayıda yavruya enjeksiyon yapmak kuluçkahane şartlarında pratik bir yöntem değildir. Yapılan bir çalışmada kaynak alabalıkları yüksek dozda inaktive edilmiş İPNV ile aşılanmış ve yüksek humoral bağışıklık tespit edilmiş buna rağmen bir sonraki deneysel İPNV enfeksiyonunda antikor seviyesi düşük çıkmış ve bağışıklık kısa sürmüştür (45).

Attenüe aşılama korunmada diğer bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Deneysel bir çalışmada salmonid yavruları avirulent bir suş ile enfekte edilmiş ancak bu avirulent suş koruma sağlamazken, tatlı su levreğinde (*Perca fluviolis*) immersiyon yoluyla yapılan aşılama başarılı olmuştur (92, 210). Canlı aşılama çevresel riskler, avirulent virusun virulent hale gelebilme ihtimali bakımından kabul görmemiştir.

Araştırmacılar İPN viral polipeptidini *Escherichia coli* bakterisinde sentezleyerek alabalıklarda subunit aşı olarak kullanmışlar ve hastalığa karşı koruma sağlamışlardır (228, 229). VP2 proteinini içeren glukan/yağlı adjuvantlı furunkulosis, vibriosis ve soğuk su viriosise karşı geliştirilen multivalent ticari aşı (NP-İPN) ile pre-smoltilarda yapılan aşılama da İPNV'na karşı koruma sağlanmıştır. Norveç'de, bu rekombinant aşının Atlantik somonlarının postsmoltilarında ticari olarak kullanımı onaylanmıştır (119, 286).

2004 yılında İPNV için genetik immunizasyon çalışmaları yapılmış, virusun A segmentinin polyproteini ile yapılan genetik aşılama çalışmalarında %84'lere varan koruma görülmüştür (242). Fakat bu konsept lisans alamamıştır. VP2 geninin aljinat mikrosferlerine enkapsüle edilerek oral yolla aşılama çalışmasında, aşılama 15 gün sonra nötralizan antikorlar gelişmiş ve aşılama müteakip 15. ve 30. günlerde yapılan viral denemede aşının %80 oranında koruma sağladığı görülmüştür (81, 83).

3. İNFEKSİYÖZ HEMATOPOETİK NEKROZİS VİRUSU (İHNV)

3.1. Giriş

İnfeksiyöz hematopoetik nekrozis virusu (İHNV), infeksiyöz hematopoetik nekrozis hastalığının (İHNH) etiyolojik ajanı olup, salmonidlerin önemli viral patojenlerindedir. Etken Atlantik somonu (*Salmo salar*), Pasifik somonu (*Oncorhynchus* spp.) ve gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*), önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır.

Etken özellikle yavru ve parmak boy balıkları etkilemektedir. Yavru ve genç gökkuşağı alabalıklarında ve somonlarda ölüm oranı %90'lara kadar ulaşabilmektedir (39, 290). 2004 yılında Kuzey Amerika'daki somon balıklarında görülen bir salgında, etkenin 200 milyon dolar gibi maddi kayba neden olduğu bildirilmiştir (221). 2001-2003 yıllarında etkenin sadece Kanada'da Atlantik somonu endüstrisinde sebep olduğu maddi kaybın yaklaşık 250 milyon dolar olduğu belirtilmiştir (226).

İnfeksiyöz hematopoetik nekrozis virusu (İHNV), Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) tarafından ihbarı mecburi ve izlenmesi gereken hastalıklar kategorisinde değerlendirilmektedir (275). Türkiye'de ise Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın, 1 Nisan 2004 tarihli ve 2004/14 sayılı tebliğinde ihbarı mecburi hayvan hastalıkları arasında yer almaya başlamıştır (19).

3.2. Etiyoloji

İnfeksiyöz hematopoetik nekrozis virusu, *Rhabdoviridae* ailesinin *Novirhabdovirus* genusunda yer almaktadır. Virion mermi şeklinde, 110 nm uzunluğunda ve 70 nm çapında olup; negatif, tek iplikli, yaklaşık olarak 11000 nükleotid içeren RNA genomuna ve membran glikoproteini içeren bir zara sahiptir (247, 318). İHNV genomu 3'-N-P-M-G-Nv-L-5' düzeninin de kodlanmış altı proteinden oluşur ve bunlar; nükleoprotein (N), fosfoprotein (P), matrixprotein (M), glikoprotein (G), non-virion protein (Nv) ve RNA polimeraz (L)'dir (318).

Enfekte hayvanlarda nötralizan antikorların oluşumuna neden olan protein virusun G proteindir (104, 236).

İnfeksiyöz hematopoetik nekrozis virusu, izolatlarının G, N ve Nv genleri sekan analizlerine göre E, J, L, M ve U olmak üzere 5 ayrı genogruba ayrılır (107, 134, 187). Bunlar;

Genogrup E : Avrupa izolatlarını,

Genogrup J : Asya izolatlarını,

Genogrup L : Kalifornia ve Güneydoğu Oregon Sahili izolatlarını,

Genogrup M : Washington'daki Kolombiya Nehri havzası ve Washington sahili havzası izolatlarını,

Genogrup U : Alaska, British Columbia ve Idaho izolatlarını, içerir.

3.3. Epidemiyoloji

İHNV ilk kez Amerika Birleşik Devletleri'nin kuzeybatısında Washington, Oregon ve Kaliforniya'da bulunan kızıl somon çiftliklerinden izole edilmiştir (304). 1970'ler ve 1980'ler boyunca etkenin neden olduğu salgınlar Birleşik Devletler'de sporadik olarak seyretmiş, 1992'de İHN Kanada'da Atlantik salmonlarında ve deniz kafesi ağlarında rapor edilmiştir (27). İHN'in Kuzey Amerika'dan Avrupa ve Asya'ya enfekte yumurta ve yavrular vasıtasıyla bulaştığı belirtilmiştir (140). İHNV'nun Kuzey Amerika'nın kuzeybatısında, Alaska'dan Kaliforniya ve Idaho'ya kadar uzanan bölgede endemik olduğu bildirilmiştir (187). Virus 1968'de Alaska'dan Japonya'ya, sonrasında Japonya'dan Kuzeydoğu Çin ve Kore'ye yayılmıştır (257, 282, 312). Etken Tayvan'da sporadik olarak izole edilmiştir (65, 365). Hastalık Avrupa'da ilk defa Fransa ve İtalya'da 1987 yılında, sonrasında Almanya'da 1992 yılında tanımlanmıştır (39). Etkenin aynı zamanda Belçika'da, sporadik olarak Slovenya, Hırvatistan, İran, Kuveyt, Pakistan, İspanya ve İsviçre'de varlığı rapor edilmiştir (140, 159, 265, 359). Virus Rusya'da 2000 yılında izole edilmiştir (305).

İnfeksiyöz hematopoetik nekrozis virusunun varlığı, Pasifik somon türleri, köpek somonu, gökkuşağı/kahverengi alabalıklarda ve Japonya'daki diğer somon türlerinde de sıklıkla rapor edilmiştir (312, 377). Yapılan deneysel çalışmalarda cutthroat alabalığının (*Oncorhynchus clarkii*) etkene duyarlı olduğu fakat gökkuşağı alabalıklarından daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Bu balıklardan enfeksiyona karşı

direnç mekanizmasını incelemek için hibritler üretilmiştir (281). Yürütülen araştırmalar, gümüş somon balığı ve pembe somon balığının enfeksiyona çok az duyarlılık gösterdiğini fakat enfekte edilebildiklerini ortaya koymuştur (113, 135). Atlantik somonunda tatlı suda ve deniz suyunda ciddi salgınlar bildirilmiştir (253, 356, 357). Atlantik somonları hastalığa karşı kızıl somonlara göre daha duyarlıdır (356). Kahverengi alabalıklar doğal enfeksiyon ve salgınlara duyarlı olup (103, 387), göl alabalığı (*Salvelinus namaycush*) deneysel olarak enfekte edilebilirken hastalığa dirençlidir (386). *S. alpinus* türü enfeksiyona tamamen dirençli olarak görülmüştür (113). Kaynak alabalığı (*S. fontinalis*) deneysel olarak enfekte edilebilmiş ve bu türde doğal salgınlar bildirilmiştir (47, 124, 386, 387). Arktik gölge balıkları (*Thymallus arcticus*) etkene karşı dirençlidir ve hastalığın rezervuarı olmadıkları bildirilmiştir (113). *Stenodus leucichthys* türü balıkların embriyonal dokularından elde edilen hücre hatlarının enfeksiyona karşı duyarlı olduğu rapor edilmiştir (114). Çipura, levrek ve kalkan balıklarında deneysel enfeksiyonlar oluşturulmuş, çipura ve kalkan türlerinde mortalite gözlenmiştir (62). Ayrıca kalkan balıklarında doğal enfeksiyon, asemptomatik olarak moleküler metodlar ile belirlenmiştir (215).

OİE tarafından en duyarlı hücre hattı EPC (Epithelioma Papulosum Cyprini) ve BF-2 (Bluegill Fry) olarak bildirilmiştir (264). Virusun gelişmesi için optimum sıcaklık 15°C'dir ve 23-25°C gibi yüksek sıcaklıklar viral replikasyonu engellemektedir (249).

Etkenin öncelikle enfekte balıkların sekret ve ekstremleri ile horizontal olarak bulaştığı belirtilmiştir (377). Vertikal bulaşma, bir jenerasyondan yavrularına yumurtaların içine ya da dışına yerleşmiş virus ile meydana gelmektedir (287). Vertikal bulaşma indirekt kanıtlara dayanmaktadır. Enfekte yumurtaların değişik coğrafi bölgelere taşınarak, yumurtaların dezenfekte edilmesine rağmen bu bölgelerde İHN salgınlarının meydana gelmesi vertikal bulaşmanın indirekt kanıtıdır (46, 257, 282, 312).

3.4. Klinik Belirtiler

İHN enfeksiyonu salmonidlerin tüm yaş gruplarında görülmesine rağmen özellikle genç balıkları etkileyen ciddi bir hastalıktır. Hastalığın spesifik bir klinik belirtisi yoktur. Akut enfeksiyonlarda balıklarda klinik belirti görülmeden artan ölümler meydana gelir. Hastalığın başlangıcında balıklarda letarji ve dönerek yüzme

gibi hiperaktivite bulguları tipiktir. Enfekte yayın balıklarında pigmentte koyulaşma, karında şişkinlik, solungaçlarda solgun görünüm, mukoid opak bir dışkı görülür. Yüzgeçlerin dibinde ve arka kısmında, solungaçlarda, ağızda, gözde ve kaslarda peteşiyel hemorajiler belirgindir. Kral somonu (*O. tshawytscha*) yavrularında başın arkasındaki bölgede deri altı hemorajik bölgeler görülebilir (14, 388). Yaşlı balıklarda daha az dış klinik belirtiler gözlenmektedir. İki yaşındaki kızıl somon balıklarında anormal yüzme, yüzgeçlerde hemoraji ve yavru somonlarda kutanöz lezyonlar ile kaynaşmış pulların varlığı gözlemlenmiştir (55, 354).

3.5. Patoloji ve Bağışıklık

Karaciğer, dalak ve böbrekte anemi, asites, sindirim kanalının besinden yoksun ve sütümsü bir sıvı ile dolu olması, bağırsakların sarımsı su gibi bir sıvı içermesi ve iç organlarda, yağ dokuda, yüzme kesesinde, peritonda, perikardiyumda, meninklerde görülen hemorajiler hastalığın makro patolojik bulgularıdır (303, 304, 377).

Histopatolojik bulgular; arka böbrek, dalak, karaciğer, pankreas ve sindirim kanalı gibi dokularda görülen dejeneratif nekroz odaklarından oluşmaktadır. Ön böbrekte başlangıçta makrofajların belirginleşmesinden ve lenfoid hücrelerin dejenere olmasından dolayı parlak lekeler görülür. Hastalık ilerledikçe ön böbrek makrofajlarının sayısı artar, sitoplazmaları vakuole olur. Aynı zamanda piknotik ve nekrotik lenfoid hücrelerine de rastlanılmaktadır. Dalak, karaciğer, pankreas, adrenal korteks ve bağırsak hücrelerinin fokal bölgelerinde, çekirdeksel polimorfizm, kromatin marjinasyonu ve nekrozlar bildirilmiştir. Tüm organda nekroz odaklarıyla birlikte çekirdekte piknozis, karyoreksis ve karyolizis görülür. Sindirim kanalının *lamina propria*, *stratum compactum*, *stratum granulosum* tabakasındaki granüler hücrelerde nekroz ve dejenerasyon ile bağırsak mukozasındaki bozulmalar fekal akıntıya sebep olur (46, 377).

Yapılan deneysel çalışmalarda virusun balıkların vücuduna solungaç, deri, yüzgeç kökleri, ağız ve özefagusun mide ile birleştiği karın bölgesinden girdiği ve viral replikasyonun ilk olarak epidermal hücrelerde başladığı görülmüştür (25, 115, 131, 136, 137, 251, 384, 385). Gökkuşuğu alabalıklarında kuyruk kökü, deri ve solungaçlar ilk ve geçici replikasyon bölgeleri olarak tespit edilmiştir (52, 58, 97,

131, 386). Kral somonlarında ise deri ve solungaçlar uzun süre enfekte olmaktadır (115).

Genç balıklarda böbrek, dalak gibi hematopoetik organlar en çok etkilendiği ve nekroz odaklarının ilk olarak görüldüğü organlardır (16, 388, 389). Tipik olarak etkene maruz bırakılan gökkuşağı alabalıklarının solungaç, deri ve bağırsaklarında enfeksiyonun ilk gününde düşük titrede virus saptanmış ve enfeksiyonun 2-4. gününde etken böbreklere, sonrasında tüm iç organlara yayılmış olarak bulunmuştur (52, 97, 386). Viral prevalans ve titre 2 hafta içinde pik yapmış ve azalmaya başlamıştır. Balıklar 28. günde hala enfekte olup 54. günden sonra virus tespit edilememiştir (97). Yapılan çalışmalarda enfeksiyonun vücuda iki önemli yolla girdiği düşünülmektedir. Birincisi solungaç yolu ile dolaşım sistemine, ikincisi ağız yolu ile gastro-intestinal sisteme ve oradanda dolaşım sistemine geçmesidir. Bu iki yolunda sistemik viremiye yol açtığı belirtilmiştir. Gastro-intestinal yolla vücuda giren etkenin böbreklerde enfeksiyonun başlamasına neden olmadığı ve ağız bölgesi ile sindirim kanalındaki epitelyal hücreleri geçici olarak enfekte ettiği ve bağ dokuya geçip vaskularize ettiği, bunun sonucunda kalbin enfekte olduğu, sonrasında sistemik bulaşmanın gözlemlendiği belirtilmiştir (97). İHNV'nun epitelyal hücreleri kolaylıkla ve geçici olarak enfekte ettiği bildirilmiş fakat birçok organda bağ dokuyu enfekte etme eğiliminde olduğu görülmüştür. Bu bulgu derinin sadece etkenin giriş yolu olmadığını, virusun böbreklerde sinüzoidleri saran endotelyal hücreleri enfekte ettiği daha sonra retikülo-endotelyal stromadan interstitiyal lökosit ve melanomakrofajlara yayıldığını göstermiştir (52). Enfeksiyonun son evresinde böbreğin hematopoetik dokuları ile glomerullerde ve böbrek tubullerinde nekroz odakları görülür (377, 389). Enfeksiyonu atlatan balıklarda skaliyozis ve lordozis gibi spinal bozukluklar görülebilmektedir (198).

Salmonidler İHNV'na karşı korunmak için doğal ve spesifik bağışıklık gösterirler. Hastalığa karşı immunitede, erken antiviral cevap (EAVC), spesifik antiviral cevap (SAVC) ve uzun süreli antiviral cevap (USAVC) olmak üzere 3 safha görülmektedir (186).

EAVC ya da doğal non-spesifik bağışıklık ilk savunma hattıdır. Bu bağışıklık İHNV'na maruz kalmayı takiben veya aşılardan sonra saatler içinde başlar ve 3-4 hafta kadar sürmektedir. Etkene karşı erken immun cevap düşük özgüllüktedir ve

diğer rhabdoviruslara karşı çapraz bağışıklık gösterebilmektedir (178, 200, 222). Aşılamadan ya da enfeksiyondan sonra gelişen bu erken bağışıklık tip-1 interferon (İFN) sistemi aracılığı ile gerçekleşmektedir. DNA aşısından sonra gelişen erken immun cevap Mx proteinleri ve İFN-1 indükleyici proteinlerin artışı ile üretilmesi temeline dayanır (178, 200, 222, 223). Kantitatif RT-PZR yöntemlerini kullanarak yapılan sonraki çalışmalar İHNV ile infekte veya aşı vasıtasıyla immunize edilmiş balıklarda İFN-1 cevabının oluştuğunu kanıtlamıştır (243, 277, 291, 307, 361). Viral enfeksiyon sonrası gelişen erken immunité, toll benzeri reseptör-8 (TLR 8), İFN-1 ve bunun indüklediği Mx, interferon düzenleyici faktör (İRF), interlökin-1 (İL-1), tümör nekrozis faktör (TNF) İL-8 gibi genlerin artışı ve ekspresyonunu içerir. Yapılan bir çalışmada Atlantik somonundan elde edilen rekombinant İFN α_2 'nin injeksiyonu sonucunda gökkuşuğu alabalıklarında 1-3 gün süren kısa süreli bir bağışıklık ve interferon indükleyici genlerin sayısında artış gözlenmiştir (275).

Erken ve non spesifik bağışıklığın son safhasında gama interferon (İFN γ) artışı gözlenmektedir. Gama interferon, hücresel bağışıklığı, sitotoksit T lenfosit markırlarını ve CD8 hücrelerini indüklemektedir. Enfekte gökkuşuğu alabalıklarında güçlü İFN cevabı, MHC-I antijenleri ile ilgili genlerin erken indüksiyonuna neden olmaktadır (130, 193, 291). Erken immun cevabı incelemek için DNA aşılamasından sonra balıkların dalağının incelenmesinde Mx ve Vig-8 (Virus İndükleyici Gen) oranlarında artış görülmüştür (291). Başka bir çalışmada DNA aşısı injekte edilmiş gökkuşuğu alabalıklarının, injeksiyon bölgesindeki kaslarda İFN-1, İFN-1, B ile T lenfositlerinin ve TNF α 'nın indüklendiği gözlenmiştir (292).

Spesifik antiviral cevap veya spesifik bağışıklık (SAVC), non-spesifik bağışıklığın sona ermesi ve ısıya bağlı nötralizan antikorların üretimi ile ilişkilidir (186, 200). SAVC, enfeksiyonun veya aşılamanın başlangıcından 3-4 hafta sonra başlar ve 6 ay kadar devam etmektedir (70, 104, 105, 132, 199, 205, 339). Etkene karşı gelişen spesifik bağışıklığın İHNV'nun G proteinine karşı oluşan nötralizan antikorlardan kaynaklandığı belirtilmiştir (69, 205, 355). Spesifik bağışıklık aşaması için birçok çalışmada DNA aşısı injeksiyon olarak kullanılmış ve aşılamadan 4-8 hafta sonra %90 koruma oranı sağlamıştır (17, 70, 186, 355).

Uzun etkili antiviral bağışıklık 2006 yılında yapılan bir çalışmayla tanımlanmıştır (186). Uzun etkili antiviral bağışıklık dönemi DNA aşısı sonrası 6.

aydan itibaren başlar ve 25. aya kadar uzar. Bu dönem seroprevalans ve nötralizan antikörlerin belirlenemez seviyelere düşmesi ile karakterizedir (186).

3.6. Teşhis

Hastalığın teşhisinde hızlı ve duyarlı metodların kullanılması hastalığın yayılımı ve salgınların önlenmesi açısından önemlidir. İHNV'nun hücre kültüründe izolasyonunu takiben serum nötralizasyon testi ile spesifik identifikasyonu altın standart olarak değerlendirilmektedir. Etkenin izolasyon ve identifikasyonu Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü tarafından standart hale getirilmiştir (264). Virusun teşhisinde böbrek ve dalak dokuları tercih edilen dokulardır (204). Pektoral yüzgeç parçalarının moleküler olarak test edilmesiyle etkenin hızlı bir şekilde teşhis edildiği bildirilmiştir (86). Damızlık stokların taranması için daha çok ovaryum sıvısı tercih edilir. Çünkü virus sperm örneğinde daha az tespit edilmiştir. Yumurtlama sonrası dişi bireylerden yapılan örneklemelerde ovaryum sıvısı hücrelerinin inkubasyona bırakılması, virusun teşhisinde hassasiyeti arttıran bir uygulama olarak bilinmektedir (201, 248, 250, 254). Hücre kültürü izolasyonu için EPC veya BF-2 hücre hatları kullanılır. EPC hücre hatları en duyarlı hücre hattıdır (264). Viral çoğalma için optimum sıcaklık 15°C'dir ve 23-25°C sıcaklıklar viral replikasyon için uygun değildir (252).

Etkenin serolojik olarak identifikasyonunda, serum nötralizasyon testi (SNT), indirekt floresan antikör tekniği (İFAT), ELİSA gibi yöntemler kullanılır. Fakat bu yöntemlerden SNT ve İFAT'nin zaman, hassasiyet, duyarlılık ve kalifiye eleman ihtiyacı gibi dezavantajları bulunmaktadır. ELİSA tekniği hastalığın teşhisinde en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir (87, 298).

Hastalığın teşhisinde moleküler metodlar en hızlı ve en hassas testler arasındadır (46). Etkenin teşhisinde kullanılan moleküler metodlar, RT-PZR, real time RT-PZR (qRT-PZR), multipleks RT-PZR (mqRT-PZR) ve moleküler padlock prop (MPP) yöntemleridir. RT-PZR etkenin identifikasyonunda, hücre kültürü izolasyonundan sonra sıklıkla kullanılan ve klasik metotlara göre çok daha hassas olan bir yöntemdir (21, 34, 50, 182, 244). RT-PZR yönteminde etken 9 saatten az bir sürede teşhis edilir. Bu yöntemin dezavantajları arasında, RNA'nın yapısının dayanıksız olması, kontaminasyon riski ve enfeksiyöz virus ile enfeksiyöz olmayan virüsü ayırt edememesi gibi faktörler bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar, RT-PZR ile

etkeni teşhis etmede organ ve üreme sıvıları gibi direkt örneklerden başarılı sonuçlar alındığını göstermiştir (34, 182, 244). Diğer araştırmalar real time RT-PZR yönteminin, geleneksel RT-PZR yönteminden daha hassas ve hızlı olduğunu ortaya koymuştur (86, 278).

3.7. Korunma ve Kontrol

İHNV'nun kontrolü iyi kuluçkahane uygulamalarına dayanmaktadır. Kontrol önlemleri virusla teması engellemek için uygulanan sıkı kontrol programlarını ve hijyen uygulamalarını içermektedir (264). Hastalığın endemik olmadığı yerlerde salgınların, hastalıklı görünen balıkların ayrılması, dezenfeksiyon, karantina gibi önlemler aracılığı ile kontrol altına alınabildiği bildirilmiştir (338). Hastalığın endemik olduğu yerlerde iyi biyogüvenlik ve sanitasyon uygulamaları virusun çiftliklere girme riskini azalmaktadır. Balıkların yaşa göre farklı havuz veya kafeslere ayrılması, tek bir türün yetiştirilmesi, kafesler arasında balık hareketlerinin azaltılması, hasta balıkların ayrılması ve yeniden stoklandırma hastalığa karşı alınan diğer önlemlerdir (308).

Hastalığın tedavisinde ya da önlenmesinde onaylanmış bir kemoterapötik ajan yoktur. Fakat yeni bileşenlerin denemeleri devam etmektedir. Yapılan bir çalışmada hücre kültüründe *methisoprinol* kullanılarak İHNV'nun replikasyonunun engellendiği bildirilmiştir (323). İn vitro çalışmalarda klorin bileşeninin, İHNV'nun hücreye tutunmasını ve hücre içine girmesini engellediği ve amantadin tributilamin bileşenlerinin de aynı etkiyi gösterdiği rapor edilmiştir (82).

İHNV'na karşı korunmada, dirençli türler yetiştirmek için yapılan selektif yetiştiricilik potansiyel kontrol mekanizmalarından biridir. Hastalığa karşı direnci artırmak için duyarlı türler dirençli türler arasında yapılan hibritleme çalışmaları olumlu sonuçlar vermiştir (64, 93, 203, 284). Etkene karşı direnç geliştirmek için yapılan genetik çalışmaların çoğu aile içindeki dirençli bireylerin çaprazlanması şeklinde gökkuşağı alabalıklarında gerçekleştirilmiştir (177).

Hastalığa karşı korunmada en dikkat çekici gelişme 2005'de Kanada'da lisanslı bir DNA aşısının geliştirilmesidir. APEX-IHN (Novartis) isimli bu aşı, İHNV'na karşı korunmada Kanada Gıda Kontrol Ajansı tarafından onaylanmıştır. Çalışmalar gökkuşağı alabalıkları ve Atlantik somonlarında İHNV G geni içeren plazmid DNA'nın kas içi enjeksiyonunun koruma sağladığını göstermiştir (17, 18,

355). Kızıl somon ve gökkuşuğı alabalıklarında yapılan sonraki araştırmalarda DNA aşısı ile etkin bir koruma sağlamak için aşının içinde mutlaka İHNV G geninin bulunması gerektiği doğrulanmıştır (69). DNA aşısının 1-2g ağırlıktaki gökkuşuğı alabalıklarında 0.1-1µg gibi dūřuk dozlarda etkili olması, bu balıklardaki tüm İHNV izlotlarına karşı 0.1µg standart dozda etkili olduğunun görülmesi, bu aşının yaygın olarak kullanılabilereği fikrini vermiştir (70, 200). Büyük balıklarda korunmanın sağlanması için aşının dozu kas içi olarak 10ng/g olarak formüle edilmiştir (223). DNA aşısının, aşılama sonrası 3 aya kadar %90, 2 yıla kadar %60 koruma sağladığı grlmştir (186). Aşının en iyi korumayı intramuskuler olarak uygulandığında sağladığı bildirilmiştir (68). Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda DNA aşısının güvenliği ve etkinliği saptanmış, balık endüstrisindeki gerekliliği de göz önüne alınarak APEX-IHN aşısına lisans verilmiş ve ticari olarak erişilebilirliği sağlanmıştır (309).

4. EPİZOOTİK HEMATOPOETİK NEKROZİS VİRUSU (EHNV)

4.1. Giriş

Epizootik hematopoetik nekrozis (EHN), Avusturalya ile sınırlı, ranaviruslardan epizootik hematopoetik nekrozis virusun sebep olduğu sistemik bir hastalıktır. Etken doğal olarak enfekte olmuş kızıl yüzgeçli tatlı su levreklerinde (*Perca fluviatilis*), yüksek mortaliteye neden olmaktadır. Virus Avusturalya'daki doğal balık türlerini tehdit etmektedir (37, 368).

Rana virusların konakçı spesifitesinin olmaması ve sınıflar arası bulaşma potansiyelinin olmasından dolayı EHNV, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OİE) tarafından ihbarı mecburi hastalıklar listesinde yer almaktadır (267). Türkiye'de ise Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın, 1 Nisan 2004 tarihli ve 2004/14 sayılı tebliğinde ihbarı mecburi hayvan hastalıkları arasında yer almaya başlamıştır (19).

4.2. Etiyoloji

Epizootik hematopoetik nekrozis virusu (EHNV), *Iridoviridae* familyasının *Ranavirus* genusunda yer almaktadır. Çift sarmallı büyük bir DNA'ya sahiptir. Etken çekirdek ve sitoplazma da replikasyon gösterebilir (155, 375).

Ranaviruslar filogenetik analizlere göre 5 gruba ayrılmaktadır. EHNV ve Avrupa yayın balığı virusu (ECV) 3. grupta yer almaktadır (156). Viral genom yaklaşık olarak 127 bin nükleotidten oluşmaktadır. Çift sarmallı DNA tekrarlanan bölgeler içerir (154, 155, 232). Guanin/sitozin içeriği DNA'nın %54-55'ini oluşturur (67).

Epizootik hematopoetik nekrozis virusu ECV ile %88 nükleotid sekans benzerliği göstermektedir. Bu birbirine benzer iki virus yaklaşık olarak 100 genden oluşur ve bu genlerin çoğunun fonksiyonu bilinmemektedir (126).

EHNV'nun kapsidi 150-160 nm çapında ve diğer iridoviruslarda yaygın olduğu gibi ikosahedral simetridir (7, 98). Major kapsid protein, 36 yapısal ve enzimatik aktivitesi olan proteinden oluşan virionun %40'nı oluşturur (67). Membran glikoproteininin ve lipidin enfektivite için gerekli olmadığı fakat mevcut olduğu durumlarda enfektiviteyi artırdığı bildirilmiştir (24, 155).

4.3. Epidemiyoloji

Etken ilk defa 1986 yılında Avusturalya’da kızıl yüzgeçli tatlı su levreklerinden (*Perca fluviatilis*) izole edilmiştir (197). Virusun sebep olduğu doğal enfeksiyon, sadece kızıl yüzgeçli tatlı su levreklerinde ve gökkuşacağı alabalıklarında görülmüştür (194, 195, 196, 197). Yapılan deneysel çalışmalar Macquarie levreği (*Macquaria australasica*), gümüş levreği (*Bidyanus bidyanus*), sivrisinek balığı (*Gambusia affinis*), mountain galaxias (*Galaxias olidus*) balığının etkene immersiyon yöntemiyle maruz bırakıldığında öldüğünü göstermiştir. Japon balığı (*Carassius auratus*), sazan (*Cyprinus carpio*) gibi bazı türlerin etkene karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (194). Virüs ile ilgili Avrupa’daki çalışmalar siyah yayın balığı (*Ameirus melas*) ve turna balığının (*Esox lucius*) etkene karşı duyarlı olduğunu göstermiştir (32, 123).

Etkenin vertikal yolla bulaşması şimdiye kadar rapor edilmemiştir (368). Horizontal bulaşma kontamine su aracılığıyla ve enfekte balıkların sekret ve ekstreleriyle meydana gelir (37, 123, 160, 161, 194, 208). EHNV’nun gökkuşacağı alabalıklarında nüksetmesi, doğal kızıl yüzgeçli tatlı su levreklerinden enfeksiyonun yeniden bulaşmasına bağlanmaktadır (230, 369). Subklinik infekte balıkların virus kaynağı olabileceği düşünülmektedir. Etken, doğal salgın sonrası hayatta kalan, klinik belirti göstermeyen kızıl yüzgeçli tatlı su levreklerinden izole edilmiştir (195). Tatlı su levreklerinin muhtemel rezervuar olabileceği fikri, deneysel enfeksiyonlar sonucunda hayatta kalan ve sağlıklı görünen balıklardan etkenin izole edilmesiyle desteklenmiştir (37, 123, 160, 161, 194, 208).

EHNV’nun 15°C’de 97 gün, 4°C’de 300 gün boyunca enfektivitesini koruduğu bildirilmiştir. Etkenin desikasyona dirençli olduğu, kurutma sonrası enfektivitesini 15°C’de 113 gün koruduğu ve dondurulmuş balıklarda 2 sene enfektif kalabildiği rapor edilmiştir (194, 369).

Virusun gökkuşacağı alabalıklarında çiftlikten çiftliğe çalışanlar vasıtası ile yayıldığına dair çalışmalar bulunmaktadır (196, 370, 372). Avusturalya’da tatlı su levreklerinde, virusun ülke içi akarsu ağı ile yayıldığı bildirilmiştir (368). Akarsulardaki bulaşmaya, hobi balıkçılığı sonucu tatlı su levreklerinin illegal yer değiştirmesi, donmuş tatlı su levreklerinin yem olarak kullanılması ve kullanılan alet

ve ekipmanların sebep olabileceği öngörülmüştür. Aynı zamanda kuşlarında enfekte balıklarla beslenmesi sonucu etkeni bulaştırabileceği rapor edilmiştir (369).

EHNV'undan dolayı kızıl yüzgeçli tatlı su levreklerinde kitlesel ölümler nadir olarak görülmüştür. Tüm yaş grupları enfekte olabilmesine rağmen, endemik bölgelerdeki ölümler daha çok yavru ve parmak boy balıklarda görülmüştür (195, 197, 369). Kızıl yüzgeçli tatlı su levreklerinde ölüm oranı %95'lere ulaşabilmesine rağmen, hastalığın gökkuşağı alabalıklarındaki etkisinin %5'den olduğu bildirilmiştir (368).

4.4. Klinik Belirtiler

EHNV'nun sebep olduğu hastalığın klinik belirtileri spesifik değildir. Enfekte balıklarda genel olarak iştah kaybı, fiziksel aktivitede azalma, ataksi ve özellikle hematopoetik dokularda hemorajiler görülür (368). Sadece tatlı su levreklerindeki salgınlarda tipik olarak kitlesel ölümler görülmüştür (195). Deneysel olarak enfekte edilen balıklarda renkte koyulaşma ve ölüm öncesi anormal yüzme hareketleri gözlemlenmiştir (194). Doğal enfekte gökkuşağı alabalıklarında etkenin düşük prevalansından dolayı herhangi bir klinik belirti görülmezken, deneysel enfekte gökkuşağı alabalıklarında renkte koyulaşma, ataksi ve iştah kaybı bildirilmiştir (295).

4.5. Patoloji ve Bağışıklık

Hastalık sonucu görülen lezyonlar, etkenin vasküler endotelial ve hematopoetik dokuları etkilemesi sonucu oluşmaktadır. EHNV özellikle hematopoetik dokularda yaygın nekrozlara neden olmaktadır (368). Enfeksiyonun makroskobik bulguları, yüzgeç kaidelerinde peteşiyel hemorajiler, aşırı miktarda serosanginöz peritoneal sıvı ile böbrek ve dalakta şişkinliktir (195, 295). Nekroz odakları genellikle küçük kan damarlarının çevresinde yoğunlaşmıştır. Tatlı su levreklerinin karaciğerinde, nekrotik odaklara benzeyen beyazımsı krem rengi odaklar görülmüştür.

Mikroskobik olarak karaciğerdeki nekrotik odakların sınırındaki hepatositlerde bazofilik intrastaplozmik inklüzyon cisimcikleri rapor edilmiştir. Böbrek ve dalaktaki inklüzyon cisimcikleri nadirdir ve görüntülenmesi zordur. İmmunohistokimyasal boyalamalar, EHNV antijeninin nekrotik bölgelerde, damar endoteliumlarında ve dolaşımdaki lökositlerde yaygın olduğunu göstermiştir (195,

295). Nekrotik hücreler genellikle kan damarları içinde dağılmıştır ve vasküler endotelial hücreleri dejenere etmektedir. Dalakta, sindirim sistemi epitellerinde, atriyal trabekülde nekrozlar, solungaç epitellerinde hiperplazi, fokal pankreatik nekroz, yüzme kesesinde nekroz ve ödem, ülseratif dermatitis enfekte balıklarda görülen diğer lezyonlardır (195, 295). Enfeksiyonu atlatan balıklarda perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu görülebilir (37).

Etkenin sebep olduğu doğal salgınlar, daha çok su sıcaklığının yüksek olduğu dönemlerde görülür (41, 123, 196, 370). Virusun bulaşması ve patojenitesinin su sıcaklığından etkilendiği bildirilmiştir (123, 160, 161, 208, 371). Tatlı su levreklerinde etkenin sebep olduğu ölümlerin 12-21°C su sıcaklığı değerlerinde meydana geldiği ve 12°C'nin altındaki sıcaklıklarda hastalığın görülmediği bildirilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalar gökkuşacağı alabalıklarının, EHNV'na 10°C ve 15°C'de immersiyon yöntemiyle maruz bırakıldığında dirençli olduklarını ve 20°C'de ölüm oranının %14-24 seviyesinde olduğunu göstermiştir (22, 194, 371). Tatlı su levreklerinde virusun intraperitoneal enjeksiyon sonucu inkubasyon periyodunun su sıcaklığı ile negatif korelasyon gösterdiği, 12-18°C'de 10-28 gün, 19-21°C'de 10-11 gün sürdüğü, gökkuşacağı alabalıklarında ise bu durumun 8-10°C'de 14-32 gün, 19-21°C'de 3-10 gün olduğu belirtilmiştir (371). Turna balıklarında (*Esox lucius*) yapılan deneysel bir çalışmada, etkene immersiyon yöntemi ile maruz bırakılan balıklarda viral yükün 12°C'de 7 gün, 22°C'de 3 gün kaldığı tespit edilmiştir (143).

Tatlı su levreklerinin değişik genetik karakterizasyon ve yetiştirme şartlarında etkene karşı duyalılıklarında farklılıklar olduğu bildirilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda Avusturalya tatlı su levreklerinin, etkene immersiyon ve intraperitoneal olarak maruz bırakıldıklarında oldukça duyarlı olduğu, 20°C'de her iki yöntemde de ölüm oranının %100'e ulaştığı, 10°C'de intraperitoneal enjeksiyon sonrası mortalitenin %50 olarak gözlemlendiği rapor edilmiştir (194, 371). Avrupa tatlı su levreklerinde yapılan deneysel enfeksiyonlarda ise balıkların virusa immersiyon yoluyla maruz bırakılması sonucu 10, 15 ve 20°C'de mortalite görülmemekle beraber balıklar intraperitoneal enjeksiyon ile etkene maruz kaldıklarında ölüm oranının 15°C'de %47-80, 20°C'de %28-42 olduğu tespit edilmiştir (22). İmmersiyon yöntemiyle yapılan deneysel enfeksiyonlar sonucunda, Avusturalya tatlı

su levreklerinin viruse karşı 0,08 DKİD₅₀/ml (%50 Doku Kültürü İnfektif Doz) dozlarda oldukça duyarlı olduğu, gökkuşağı alabalıklarının ise 10^{2,2} DKİD₅₀/ml dozlarda bile direnç gösterdiği bildirilmiştir (371).

4.6. Teşhis

EHNV'nun teşhis edilmesinde virusun varlığının tespit edilmesiyle birlikte standart histolojik tekniklerden yararlanılır. Immunohistokimyasal ve immunofloresan boyama tekniklerinde poliklonal antikorlar kullanılmıştır (41, 160, 295). Bu antikorlar tüm ranavirusların major kapsid proteinleri ile çapraz reaksiyon gösterdiklerinden dolayı virus türünün belirlenmesinde moleküler karakterizasyon tekniklerinin kullanılması daha güvenilir sonuçlar vermektedir (148). Elektron mikroskobu etkeni dokularda gösterebilmesine rağmen, virus diğer ranaviruslardan görünüm olarak ayırt edilemez (6, 268). Hastalığın teşhisinde hücre kültürü izolasyonu ile birlikte ELİSA gibi antijen belirleme metodları ve PZR metodları kullanılmaktadır (268, 368). Testler için uygun örneklemelerde balıkların karaciğer, dalak ve böbrek dokuları alınıp birleştirilir (373). Sperm ve ovaryum sıvısı teşhis için uygun dokular değildir.

Etken hücre kültüründe 15-22°C arasında FHM (fathead minnow), RTG (rainbow trout gonad), BF-2 (bluegill fry), CHSE-214 (Chinook salmon embryo) hücre hatlarından izole edilebilir (72, 197, 268). Hücre kültürü sonrası identifikasyon immunofloresan ve PZR ile yapılmaktadır (41). Virusun identifiye edilmesi için OİE tarafından konvensiyonel PZR tekniği tanımlanmıştır (268).

4.7. Korunma ve Kontrol

EHNV'nun sebep olduğu, epizootik hematopoetik nekrozis hastalığının etkili bir tedavisi yoktur. Bu nedenle iyi uygulanan biyogüvenlik önlemleri hastalığın kontrolünde büyük önem arz etmektedir (266). Bu biyogüvenlik uygulamaları yetiştirilicek balıkların hastalıktan ari işletmelerden alınması, işletmeye giren suyun dezenfeksiyonu ve endemik bölgelerde vektörlerin kontrolü gibi önlemleri içerir. İşletmelere yeni alınan balıkların 32 gün kadar karantina altına alınması önerilmektedir (371). Hastalıktan ari bölgelerin belirlenmesi için aktif sürveyans programları uygulanmalıdır (267).

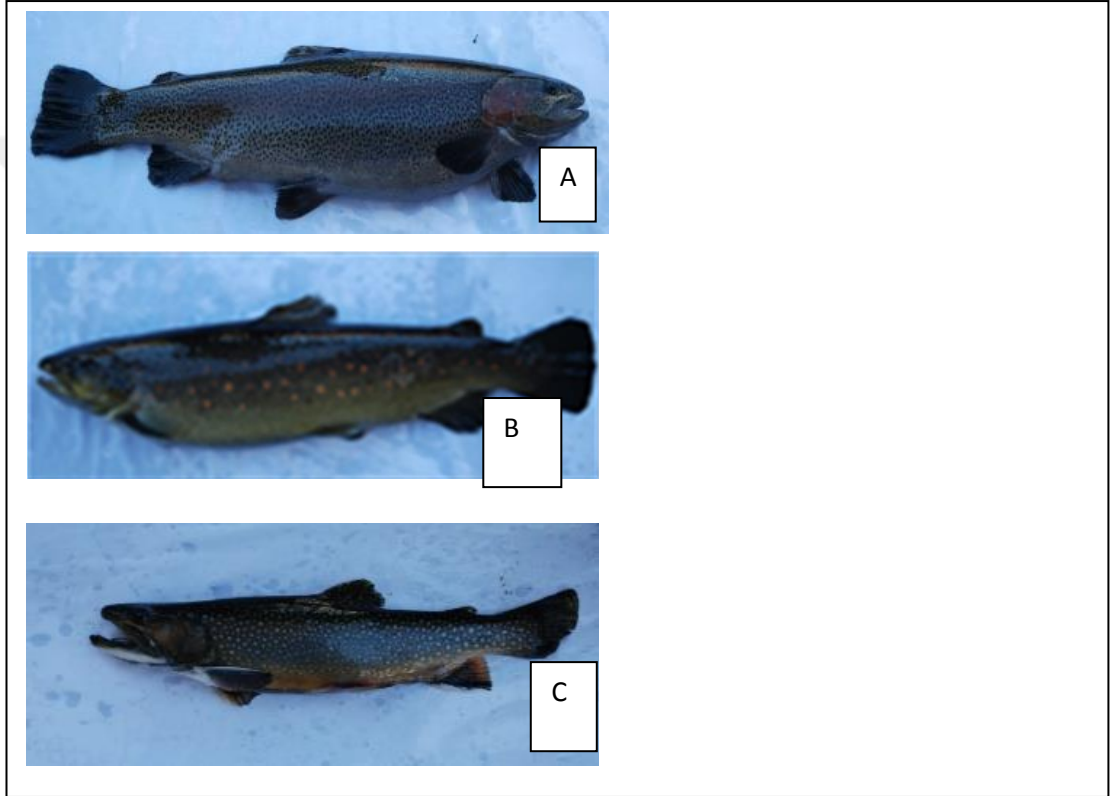
Iridoviridae ailesinin *Megalocytivirus* genusu için makul ve uygulanabilir aşı çalışmaları yapılmasına rağmen EHNV için bu alandaki çalışmalar sınırlı olup aktif olarak kullanılmakta olan lisanslı bir aşı yoktur (189). Etken için spesifik antikor cevabını belirleyebilen teknikler olmasına rağmen, bağışıklık için daha ileri çalışmalar gerekmektedir (371, 372).

Yapılan deneysel enfeksiyonlarda, etken aynı ortamda bulunan tatlı su levreklerinden gökkuşuğu alabalıklarına direkt temastan ziyade sadece su aracılığı ile bulaşma meydana geldiği için çiftliklere giren suyun dezenfeksiyonu önemlidir (22, 194). Herhangi bir salgın anında kontaminasyonu engellemek için temizlik ve dezenfeksiyon uygulamaları gereklidir. EHNV'nun, 200 g/L sodyum hipoklorit, %70 etil alkol çözeltisi ve 150 mg/L klorheksidinde 1 dakika da inaktive olurken 200 mg/L potasyum peroksimonosülfat çözeltisinde ve 60°C sıcaklıkta 15 dakikada inaktive olduğu bildirilmiştir (54, 192, 194).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Örnekler

Örnekleme çalışmaları, Artvin, Rize, Trabzon, Gümüşhane, Bayburt, Giresun ve Ordu illerinde bulunan ve rastgele seçilen 20 alabalık işletmesinde yetiştirilen Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax*) ve Kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*) türlerinden yapılmıştır (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. Örnek alınan balık türleri. (A) Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), (B) Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax*), (C) Kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*).

Seçilen işletmelerden, Mayıs-Haziran 2014 ile Mayıs-Haziran 2015 arasında 2 defa, 0-6 aylık ve 6-12 aylık yaş gruplarından ve 3 türden(gökkuşığı, karadeniz, kaynak) en az 30 balık olmak üzere 20 işletmeden toplam 2100 balık örneği toplanmıştır. Ayrıca örnekleme zamanlarında havuzlardaki su sıcaklıkları portatif ölçüm cihazı(WTW315İ) ile ölçülmüştür.

5.2. Araştırma Metodu

Toplanan örneklerde, viral etkenlerin izolasyonu ve identifikasyonu (PZR/ RT-PZR) *Laboratory Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*'daki metotlara göre yapılmıştır (43, 263, 264).

5.3. Örneklerin Laboratuvara Nakli ve Laboratuvar Çalışmaları

Toplanan örnekler dondurulmadan soğuk zincir ile laboratuvara ulaştırıldı. Örnekler hücre üretme vasatı ile sulandırılarak (1/10) homojenizatör (Lab-GEN 7B, ColeParmer Instrument Company, Illinois, ABD) yardımıyla homojenize edildiler. Homojenizasyon için 6 gramdan küçük balıkların tamamı, 6 gramdan büyük balıkların karaciğer, dalak ve böbrek dokuları kullanılmıştır. Homojenizatlar 3000 rpm'de +4°C'de 20 dk. santrüfuj edilerek, üsteki sıvı bir steril tüpe alınarak üzerine konsantre antibiyotik ilavesi yapıldı. Antibiyotik ilavesinden sonra sterilit kontrolü için kanlı agara ekim yapıldı ve hem RNA/ DNA hemde virus izolasyonu çalışmalarında kullanılmak üzere -86°C'ye(UF-314, Heto-Holten AS, Gydevang, Danimarka) kaldırıldı (Şekil 5.2.).



Şekil 5.2. Örneklerin laboratuvar çalışmalarına hazırlanması.

5.4. Viral RNA/DNA Ekstraksiyonu

-86 °C da bulunan virus örneklerinden (homojenizat sıvılarından) RNA ve DNA ekstraksiyonu için hazır ticari kitler kullanılmıştır.(RNA-RNeasy mini kit ve DNA-QIAamp cador pathogen mini kit, Qiagen). İşlemler kit protokollerine göre gerçekleştirilmiştir.

5.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Örnekler de İPNV, İHNV, VHS virus identifikasyonu tek aşama RT-PZR (263, 264), EHNV identifikasyonu ise klasik PZR yöntemi ile yapılmıştır (264). RNA içeren virusların tanımlanmasında tek aşama RT-PZR kit (Qiagen) kullanılmıştır.

5.5.1. Pozitif Kontroller

PZR/ RT-PZR testlerinde pozitif kontrol olarak kullanılacak viruslar (EHNV, İPNV, İHNV, VHSV) Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsünden alınmıştır.

5.5.2. RT-PZR/ PZR Protokolleri

Tablo 5.1. İPNV, İHNV, VHSV için RT-PZR karışımı (Qiagen OneStep kit).

5x Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	5 µl
dNTP Mix (10 m M)	1 µl
Primer F (10 pmol)	1 µl
Primer R (10 pmol)	1 µl
OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1 µl
Örnek RNA	2 µl
DW2 su	14 µl
Toplam	25 µl

Tablo 5.2. EHNV için PZR karışımı.

Master mix (Qiagen)	12,5 µl
DW ₂ su	8,5 µl
F Primer (10 pmol)	1 µl
R Primer(10 pmol)	1 µl
DNA	2 µl
Toplam	25 µl

5.5.3. PZR/ RT-PZR Amplifikasyonunda Kullanılan Primerler

Tablo 5.3. PZR ve RT-PZR’nda kullanılan primerler (43, 264).

İHNV (693 bp) Upstream: 5'-AGA-GAT-CCC-TAC-ACCAGA-GAC-3' Downstream: 5'-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTGCAA-3'
VHSV (505 bp) VN Forward: 5'-ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGT-GAA-GCG-3' VN Reverse: 5'-GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCC-C-3'
İPNV (174 bp) İPNV-F: 5'-AAA-GCC-ATA-GCC-GCC-CAT-GAA C-3' İPNV-R : 5'-TCT-CAT-CAG-CTG-GCC-CAG-GTA C-3'
EHNV (580 bp) Reverse primer: 5'-AAA-GAC-CCG-TTT-TGC-AGC-AAA-C-3' Forward primer: 5'-CGC-AGT-CAA-GGC-CTT-GAT-GT-3'

5.5.4. PZR ve RT-PZR Programı

Tablo 5.4. PZR ve RT-PZR’nda kullanılan ısı döngüsü (43, 264).

İHNV	İPNV	VHSV	EHNV
50°C 30 dk. (1)	50°C 30 dk. (1)	50°C 30 dk. (1)	RT aşaması yok
95°C 15 dk. (1)	95°C 15 dk. (1)	95°C 15 dk. (1)	
95°C 30 s (30)	94°C 30 s (35)	94°C 30 s (35)	95°C 60 s (35)
50°C 30 s	50°C 30 s	55°C 30 s	55°C 60 s
72°C 60 s	72°C 60 s	68°C 60 s	72°C 60 s
72°C 7 dk. (1)	72°C 10 dk. (1)	68°C 7 dk. (1)	72°C 15 dk. (1)
4°C (∞)	4°C (∞)		4°C (∞)

5.5.5. PZR/ RT-PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

Elektroforez için TAE buffer (40 mM Tris-acetate [pH 7,2], 1 mM EDTA) kullanıldı. TAE buffer içerisinde %1,5'luk agaroz jel (Sigma, Steinheim,Almanya) hazırlandı. PZR/ RT-PZR ürünlerinden 10 µl alınıp 1 µl Loading Dye (Promega, Madison, Wisconsin, ABD) ile karıştırıldıktan sonra ethidium bromide konan jelin her kuyucuğuna 10 µl konarak elektroforezde 100 watt akımda 25-35 dakika yürütülerek UV altında bantlar görüntülendi.

5.6. Virus izolasyonu

PZR/ RT-PZR pozitif örneklerden virus izolasyonu amacı ile Bluegill fry-2 (BF-2) ve Epithelioma papulosum cyprini (EPC) hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler, 24 kuyucuklu hücre üretme pleytlerine (300.000 hücre/ml) %10 fetal bovine serum (FBS) ve % 1 antibiyotik-antimikotik (10000 IU/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin, 0,025mg/ml amfoterisin B) içeren MEM Earle vasatı ile pasajlandı. 24 kuyucuklu pleytteki vasatlar boşaltılarak, daha önceden hazırlanan doku homojenatı (1/10 oranında hücre üretme vasatı ile sulandırılmış) 0,45µm enjektör filtreden (Sartorius AG, Goettingen, Almanya) geçirildi ve 2 kuyucuğa bir örnek olmak üzere 100 µl örnek suspansiyonu inokule edildi. 10–15°C de 0.5–1

saat beklendi. Sonra her kuyucuğa hücre kültürü vasatından 1ml ilave edilir. 15 °C de 7-10 gün boyunca inkübasyona bırakılarak her gün CPE oluşumu yönünden pleytler izlendi. Her bir örnek hücre kültürlerinde 2 kez pasajlandı.

5.7. İstatistiki Analiz

Çalışmanın sonuçları ki kare (X^2) testi kullanılarak değerlendirildi (Minitab 14.1 version). $P < 0,05$ değeri istatistiki açıdan önemli kabul edildi.



6. BULGULAR

6.1. Alabalık İşletmelerinde Elde Edilen Genel Bulgular

2 yıl boyunca seçilen 20 alabalık işletmesinden her yaş grubundan toplam 2100 balık örneği toplanmıştır. Toplanan balıkların doku örneklerinde RT-PZR/ PZR metodları ile İPNV, VHSV, İHNV ve EHNV genom varlığı araştırılmıştır. RT-PZR/ PZR ile örnekleme yapılan işletmelerde İHNV, VHSV, EHNV genom varlığı tespit edilemezken; 20 çiftliğin 10'unda İPNV (Şekil 6.1.) identifiye edilmiştir. İPNV RT-PZR pozitif doku örneklerinden (10) BF-2 ve EPC hücre kültürlerine ekim yapılarak, her iki hücre hattında 7. günde CPE oluşumları gözlemlenmeye başlanmıştır. İPNV izolasyonunda, BF-2 (10/10) hücre kültürünün EPC'den (5/10) daha duyarlı olduğu gözlenmiştir (Tablo 6.1.). Bu sonuç istatistik analiz sonuçları ile de doğrulanmıştır (Tablo 6.6.). CPE gözlemlenen örneklerin hücre pasaj sıvıları RT-PZR ile viral nükleik asit yönünden kontrol edilmiş ve tüm CPE gösteren örneklerin pasaj sıvılarında İPNV genom varlığı doğrulanmıştır.

Tablo 6.1. Örnek sayıları, RT-PZR/PZR ve virus izolasyon sonuçları.

İşletme Kodu	Örnek Sayısı	İzolasyon(İPNV)		RT-PZR			PZR
		BF-2	EPC	İPNV	IHNV	VHSV	EPNV
A1 (Artvin)	100	+	+	+	-	-	-
A2	100	+	+	+	-	-	-
A3	100	+	-	+	-	-	-
A4	100	-	-	-	-	-	-
A5	100	+	+	+	-	-	-
R1 (Rize)	100	-	-	-	-	-	-
R2	100	+	-	+	-	-	-
R3	100	+	+	+	-	-	-
R4	100	-	-	-	-	-	-
R5	100	-	-	-	-	-	-
T1(Trabzon)	100	+	+	+	-	-	-
T2	100	+	-	+	-	-	-
T3	100	-	-	-	-	-	-
T4	100	-	-	-	-	-	-
GR1(Giresun)	100	-	-	-	-	-	-
GR2	100	-	-	-	-	-	-
GR3	100	+	-	+	-	-	-
O1 (Ordu)	150	+	-	+	-	-	-
GM1(Gümüşhane)	100	-	-	-	-	-	-
B1(Bayburt)	150	-	-	-	-	-	-
Toplam	2100	10	5	10	0	0	0

Tablo 6.2. Örnekleme zamanlarındaki su sıcaklıkları.

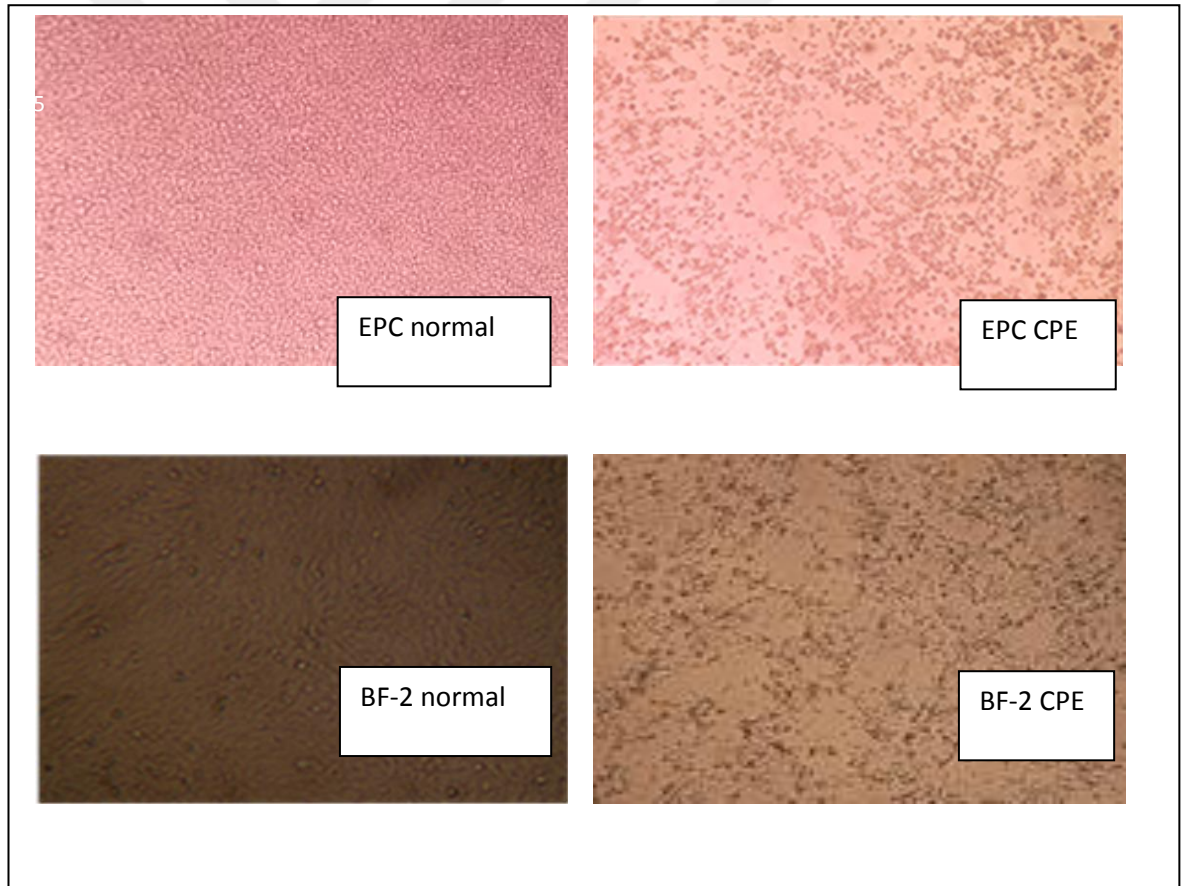
İşletme Kodu	Mayıs	Kasım2014	Mayıs
	Haziran 2014	Mart 2015	Haziran 2015
	°C	°C	°C
A1	13,5	6,1	7,6
A2	13,9	8,7	12,3
A3	13,3	4,8	13,8
A4	11,0	6,3	10,1
A5	13,9	4,6	12,0
R1	13,8	7,7	12,5
R2	12,4	6,6	10,3
R3	12,0	3,8	11,1
R4	13,2	11,0	13,6
R5	13,2	11,9	13,4
T1	11,3	10,7	12,1
T2	11,0	12,4	12,6
T3	10,5	1,5	9,4
T4	12,0	6,2	11,2
GR1	12,7	6,2	12,0
GR2	10,6	5,5	10,0
GR3	11,4	10,6	12,0
O1	11,3	3,4	12,6
GM1	13,1	11,1	10,0
B1	11,8	3,0	10,8

6.2. İPNV Jel Elektroforesis Görüntüsü



Şekil 6.1. İPNV jel görüntüsü pozitif örnekler 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, Pozitif kontrol 12 (İPNV F-R primer 174 bp), Negatif kontrol 13 (43).

6.3. İPNV İzolasyon Görüntüleri



Şekil 6.2. Normal ve CPE oluşan İPNV pozitif hücre kültürleri.

6.4. İstatistiki Analiz Sonuçları

RT-PZR ile İPNV genom varlığı yönünden incelenen 20 işletmeye ait balık örneklerinden elde edilen sonuçlar Ki-kare testi (Minitab 14.1 version) ile incelendi. İPNV virus genom varlığı yönünden balık örneklerinde illere ve balık türlerine göre dağılımda istatistiki açıdan bir fark tespit edilemedi (Tablo 6.3., Tablo 6.4.). Sonuçların yaşlara göre dağılımı Ki-kare testi ile incelendiğinde, yaşlar arasında istatistiki açıdan fark tespit edildi (Tablo 6.5.).

Tablo 6.3. İllere göre RT-PZR sonuçları.

	pozitif	negatif	toplam	%
Artvin	4	1	5	80
Rize	2	3	5	40
Trabzon	2	2	4	50
Giresun	1	2	3	33,3
Ordu	1	0	1	100
Gümüşhane	0	1	1	0
Bayburt	0	1	1	0

İstatistiki açıdan herhangi bir fark tespit edilmedi ($P>0,05$).

Tablo 6.4. Balık türlerine göre RT-PZR sonuçları.

	pozitif	negatif	toplam	%
Gökkuşuğu	6	14	20	30,00
Karadeniz	3	11	14	21,43
Kaynak	1	0	1	100

İstatistiki açıdan herhangi bir fark tespit edilmedi ($P>0,05$).

Tablo 6.5. Yaşlara göre RT-PZR sonuçları.

	% Pozitif
1 ay	66 ^a
2 ay	62 ^{ab}
3 ay	50 ^{bc}
4 ay	56 ^b
5 ay	26 ^d
6 ay	40 ^{cd}
11-12 ay	70 ^a

ab.bc.b.d.cd Aynı sütundaki değerler arasında farklı harf taşıdıklarından istatistiki açıdan fark önemlidir (P <0,001); ^aaynı sütundaki değerler arasında aynı harf taşıdıklarından istatistiki açıdan herhangi bir fark tespit edilmedi.

RT-PZR pozitif örnekler BF-2 ve EPC hücre kültürlerinde 2 kez pasajlanması sonucunda elde edilen sonuçlar Ki-Kare testiyle değerlendirildiğinde, hücre kültürü türlerine göre virus izolasyon sonuçları arasında istatistiki açıdan fark tespit edildi (Tablo 6.6.).

Tablo 6.6. Hücre kültürü türlerine göre virus izolasyon sonuçları.

		EPC	
		pozitif	negatif
BF-2	pozitif	5 (%25)	5 (%25)
	negatif	0(%0)	10(%50)

İstatistiki açıdan fark önemlidir (P =0,01).

7. TARTIŞMA

Gerek dünyada ve gerekse Türkiye’de İPNV, VHSV, İHNV ve EHNV alabalıklarda önemli kayıplara yol açan en önemli viral ajanlar olarak kabul edilmektedir. Bu etkenler aynı zamanda ekonomik ve ticari öneme sahip hastalıklar olarak bilinmektedirler. VHS, İHN ve EHN, OİE (Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü) tarafından ihbarı mecburi hastalıklar kapsamına alınmıştır ve ülkemizde Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı’nın ihbarı mecburi hastalıklar listesinde yer almaktadır. İPNV 2007 yılına kadar ihbarı mecburi hastalık kapsamında iken bu tarihte bu kapsamdan çıkarılmıştır (19, 264)

VHSV bütün dünyada alabalıkların en önemli viral etkenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Hastalığın Avrupa’da alabalık çiftliklerinde ciddi ekonomik kayıplara yol açtığı bildirilmiştir (326). Yapılan çeşitli araştırmalarda VHS etkeni Kuzey Amerika, Asya ve Avrupa’yı da içine alan kuzey yarım kürede 82 farklı balık türünde izole edilmiş, 17 balık türünün de deneysel olarak bu virusa duyarlı olduğu görülmüştür (269). Deniz ve tatlı sularda VHSV bulunmakla birlikte, deniz ve tatlı su formlarının patojenitesinin farklı olduğu bildirilmiştir (326). Bütün dünyadaki suşlar 4 temel genogrup (genogrup I, II, III, IV) içinde sınıflandırılmıştır. Karadeniz’de VHSV ilk kez Gürcistan’da gökkuşuğu alabalıklarında rapor edilmiş ve genotip Ie içerisine yerleştirilmiştir (100).

Türkiye’de ilk kez Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü (SUMAE) tarafından üretilen Karadeniz kalkan balığı (*Psetta maxima*) yavrularında 2004 yılında kitlesel ölümler meydana geldi ve enstitü çalışanları tarafından viral bir hastalıktan şüphelenilmiştir. Vaka sonrası, yavru-anaç adayı balıklardan alınan örnekler Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü’ne teşhis için gönderilmiştir. Bornova Enstitüsünce yapılan tetkikler sonucunda, kalkan balığı yavrularında ölümlere yol açan etkenin VHSV olduğu tespiti yapılmış ve Turbot (*Scophthalmus maximus*) türünde ilk izolasyon ve identifikasyon olarak rapor edilmiştir (172).

SUMAE’de 2005 yılında doğal ve kültür kalkan balıklarında yapılan bir çalışmada VHSV BF-2 hücre hattında izole edilip, RT-PZR ile identifiye edilmiştir. Bahsedilen çalışmada, kalkan balıklarından izole edilen VHSV izolatının Gürcistan’da alabalıklardan izole edilen VHSV-GE-1,2 izolatına % 98 benzerlik gösterdiği ve genotip I-e grubunda yer aldığı belirlenmiştir. Bu izolatlarla yapılan

deneysel bir çalışmada, Karadeniz kalkan balığı (*Psetta maxima*) larvaları ve gökkuşığı alabalığı yavruları VHSV'na immersiyo ve enjeksiyo yöntemleriyle maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucunda, VHSV izolatlarının kalkan balıkları için düşük patojenik, gökkuşığı alabalıkları için ise apatojenik oldukları ortaya konulmuştur (256).

Karadeniz'de 2007-2009 yılları arasında yürütölen başka bir araştırmada, 12 tür deniz balığı ve kültür alabalıklarında VHSV taraması yapılmış, sadece kalkan balıklarından etken izole edilmiştir. İzole edilen VHS virusları ile yapılan deneysel enfeksiyo çalışmalarında virusun alabalıklar için patojenik olmadığı gösterilmiştir. Çalışma sonucunda, kalkanlardan elde edilen 5 izolatın genogrup-I ait olduğu ve VHSV'nun karadeniz kalkanlarında endemik olduğu anlaşılmıştır (153).

Doğu Karadeniz bölgesinde, 2006 ve 2010 yılları arasında yapılan diğer bir çalışmada, kültür gökkuşığı alabalıkları (*O. mykiss*) ve doğadan avlanan mezzit (*M. merlangus euxinus*) dahil 17 doğal balık türünde VHSV taraması yapılmış, alabalıklarda VHSV'na rastlanmazken, mezzit balıkları dahil 12 doğal balık türünde VHSV izole edilmiştir (12, 13, 260, 261). Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'nün yaptığı taramalarda, 2006 yılında Bolu'da gökkuşığı alabalıklarında (*O. mykiss*) VHSV'nun izole edildiği bildirilmiş ise de alınan önlemler sonucu sonraki taramalarda alabalıklarda etkene rastlanmamıştır (173).

Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki alabalık kuluçkahanelerinde ve yavru alabalıklarda yaptığımız tarama çalışmasında, taranan 20 çiftlik ve kültürü yapılan 3 balık türünde (Gökkuşığı alabalığı *Oncorhynchus mykiss*, Karadeniz alabalığı *Salmo trutta labrax* ve Kaynak alabalığı *Salvelinus fontinalis*), VHSV etkenine rastlanmamıştır. Bununla birlikte etkene Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki doğal deniz balıklarında rastlanması ve virusun bölgedeki doğal balık türlerinde endemik olması dikkat çekicidir.

İPN hastalığına ait bulgular Türkiye'de ilk kez, çeşitli klinik belirtiler ve ölümler görölen çiftliklerden alınan gökkuşığı alabalığı organlarından yapılan histopatolojik incelemelerde tanımlanmıştır (350). Sonraki yıllarda değişik bölgelerden tipik hastalık belirtisi gösteren gökkuşığı alabalıklarından alınan örneklerde İPNV varlığı RT-PZR tekniği ile kanıtlanmış ve ölkemizde RT-PZR tekniği ile yapılan ilk İPNV teşhisi olarak rapor edilmiştir (60). 2006-2008 yıllarında

Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yapılan çalışmalarda, İPNV'nun bölgedeki alabalık çiftliklerinde ve deniz kafeslerinde yetiştirilen alabalıklarda yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir (10, 259, 261). 2010-2011 yıllarında, Türkiye'nin farklı bölgelerinde (Doğu, Güneydoğu, İç Anadolu ve Akdeniz bölgeleri) bulunan toplam 30 gökkuşacağı alabalığı çiftliğinde yürütülen bir araştırmada, çiftliklerin 17'sinde (%56,6) İPNV varlığı tespit edilmiştir (129). Balık Hastalıkları konusunda Ulusal Referans Laboratuvarı olan Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'nün Viroloji Bölümü tarafından 2004-2011 yıllarında yapılan rutin teşhis ve epidemiyolojik tarama çalışmaları sonucunda, İPN virusunun Türkiye karasularında bulunan balık türlerinde yaygın olarak bulunduğu ortaya konulmuştur (173).

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde bulunan toplam 20 alabalık işletmesinde yürütülen bu çalışmada, Artvin'de 5 işletmenin 4'ünde, Rize'de 5 işletmenin 2'sinde, Trabzon'da 4 işletmenin 2'sinde, Giresun'da 3 işletmenin 1'inde, Ordu'da 1 işletmede İPN virusu saptanırken, Gümüşhane ve Bayburt illerinde örnekleme yapılan işletmelerde etken tespit edilememiştir. Toplam 20 işletmenin 10 tanesinde (%50), 7 ilin 5'inde (%71,42) İPNV genom varlığı tespit edilmiş olup, bölge alabalık işletmelerinde İPNV prevalansının yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışma ile araştırılan her yaş gurubu ve tüm alabalık türlerinde (gökkuşacağı, karadeniz, kaynak) İPNV varlığı ortaya konulmuş bulunmaktadır. Albayrak ve arkadaşlarının (10), 2006-2007 yıllarında Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi'nde gökkuşacağı alabalıklarında yaptığı bir çalışmada, 9 ilin 4'ünde (%44,44) ve 32 işletmenin 10'unda (%31,25) İPNV varlığı tespit edilmiştir. Öğüt ve arkadaşları (261), tarafından Aralık 2006 - Temmuz 2007 yılları arasında Doğu Karadeniz Bölgesinde bulunan toplam 28 gökkuşacağı alabalığı işletmesinde yapılan başka bir çalışmada ise, örnekleme yapılan işletmelerin 15'i (%53,57) İPNV ile enfekte bulunmuştur. Aynı bölgede gerçekleştirilen bu iki araştırma sonuçları yaptığımız çalışma sonuçlarını destekler nitelikte olup, İPNV enfeksiyonlarının bölge alabalık işletmelerinde yaygınlığını ve bu işletmelerde balık ölümlerinden dolayı önemli ekonomik kayıplara yol açtığını ortaya koymaktadır. Ayrıca bu çalışmada Karadeniz bölgesinde kültürü yapılan Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax*) ve kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*) türlerinde İPNV varlığı ilk kez tespit edilmiş olup, daha önceki çalışmalarda bölgedeki bu balık türlerinden etkenin izole edildiğine dair

bilgiye rastlanmamıştır. Artvin ilinde virusun yüksek oranda izole edilmesinin (%80), bu ilde kontrolsüz balık hareketlerinin yoğun olmasından ve baraj göllerindeki balık kafeslerindeki horizontal bulaşmadan kaynaklanabileceğini akla getirmektedir. Gümüşhane ve Bayburt illerinde İPNV varlığı tespit edilememiştir. Bu sonucun alınmasında, örnekleme yapılan işletmelerde dışarıdan kontrolsüz balık girişinin ve horizontal bulaşmaya mahal verecek deniz/barajlarda balık kafeslerinin bulunmaması gibi basit önlemler etkili olmuş olabilir.

Yapılan bu çalışmada İPNV pozitif (10) sonuçların, 6'sı gökkuşığı alabalıklarından, 3'ü Karadeniz alabalıklarından, 1'i kaynak alabalıklarından elde edilmiştir. De las Heras ve ark.'nın (83), yaptığı deneysel bir çalışmada gökkuşığı ve kahverengi alabalıklara (*Salmo trutta*) İPNV verilmesi sonucunda 15. günde total mortalite oranları bu balık türlerinde sırasıyla %80 ve %85 olarak meydana gelmiş olup, kahverengi alabalıklarının gökkuşığı alabalıklarına göre daha duyarlı oldukları sonucuna varılmıştır. Silim ve ark.'nın (321), farklı alabalık türlerinin İPNV'na olan duyarlılıklarını tespit etmek amacı ile yaptıkları deneysel bir çalışmada, 5-6 haftalık kaynak, gökkuşığı ve Amerikan göl alabalıkları (*Salvelinus namaycush*) İPNV'na immersiyon yöntemiyle maruz bırakılmış ve 21. güne kadar ölüm olayları kaydedilmiştir. Çalışma sonucunda ölüm oranları kaynak alabalıklarında %46, gökkuşığı alabalıklarında %9, Amerikan göl alabalıklarında %2,7 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada, hastalığa karşı kaynak alabalıklarının gökkuşığı alabalıklarından daha duyarlı oldukları saptanmıştır (321). Bu çalışmaların aksine, yaptığımız çalışmada İPNV'nun tüm işletmelerde gökkuşığı alabalıklarında %30, Karadeniz alabalıklarında %15 ve kaynak alabalıklarında %5 oranında tespit edilmesinin sebepleri olarak; her üç balık türünün tüm işletmelerde eşit oranda yetiştirilmemesi, türler arası örnekleme eşit sayıda olmaması, bölgesel izolat farklılığı ve çevresel faktörler gibi unsurlar düşünülmektedir.

Frantsi ve ark.'nın (116), sıcaklık ve yaş faktörlerinin İPNV virulensi üzerine etkisini araştırdıkları deneysel bir çalışmada; 2 aylık kaynak alabalıkları, 4,5°C, 10°C ve 15°C'de İPN-Pem-P1 suşuna maruz bırakılmış ve ölüm oranları 10°C'de % 74, 15°C'de %46 gibi yüksek, fakat 4,5°C'de son derece düşük bulunmuştur. Yine aynı çalışmada, 10°C'de 1-6 aylık yaşlardaki kaynak alabalıkları İPN-Pem-P1 suşuna maruz bırakılmış ve mortalite 1 aylık balıklarda %83, 2 aylık balıklarda %74, 4 aylık

balıklarda % 45 oranında tespit edilmiştir. 6 aylık balıklarda ise kayda değer bir ölüm oranı bulunmamıştır. Dorson ve ark.'nın (96), İPNV'nun Sp suşu ile gökkuşağı alabalıklarında yaptıkları deneysel enfeksiyonda balıklar 6°C, 10°C ve 16°C'de etkene maruz bırakılmış ve ölüm oranları izlenmiştir. Çalışma sonucunda yaşın artmasıyla birlikte enfeksiyonun azaldığı, etkenin 10°C'de pik yaptığı, 6°C ve 16°C'de enfeksiyonun baskılandığı bildirilmiştir. Yaptığımız bu çalışmada, İPNV 1-6 aylık balıklarda %65, 11-12 aylık balıklarda %70 oranında bulunmuştur. Önceki çalışmalar ile çelişen bu sonucun, sıcaklık dalgalanmalarının balıklar üzerinde stres oluşturmasından kaynaklanabileceğini akla getirmektedir. Ancak daha net bir karşılaştırma yapabilmek için bölgede izole edilen izolat ile her üç balık türünde değişik sıcaklıklar ve yaşlarda enfeksiyon denemesi yapılması gerekmektedir.

Lorenzen ve ark.'nın (219), değişik hücre hatlarının farklı balık viruslarına karşı duyarlılıklarının ortaya koyulduğu bir çalışmada, 3 farklı balık virusu (VHSV, İHNV ve İPNV), 5 farklı hücre hattına (CHSE-214, BF-2, EPC, RTG-2 ve FHM) inokule edilmiş ve inokulasyondan belli bir süre sonra hücre hatlarında oluşan viral titreler hesaplanmıştır. Çalışma da, BF-2 ile CHSE-214 hücre hatları İPNV izolasyon çalışmalarında diğer hücre hatlarından daha duyarlı olarak bulunmuştur (Lorenzen 1999). Bu çalışmada, virus izolasyon sonuçlarımız Lorenzen ve ark.'nın (219), yaptığı çalışma sonuçları ile uyumlu olarak bulunmuştur. 20 alabalık işletmesinden elde edilen balık örneklerinden hazırlanan doku homojenizatlarından viral etkenleri izole etmek amacı ile hücre inokulasyonunda BF-2 ve EPC hücre hatları kullanılmıştır. RT-PZR ile İPNV pozitif (10) bulunan örneklerden yapılan inokulasyonların tamamında BF-2 hücre hattında sitopatik efekt (CPE) gözlemlenirken (10/10), EPC hücre hattında pozitif örneklerin %50'sinde sitopatik efekt gözlemlendi (5/10). BF-2 ve EPC hücre hatları arasında duyarlılık açısından istatistiki olarak da bir fark tespit edildi. BF-2 hücre hattının EPC hücre hattından daha duyarlı olduğu bulundu. Bununla birlikte hücreler CPE görülmesi yönünden karşılaştırılmış olup viral titreler hesaplanmamıştır. Çalışmada, viral titrenin hesaplanması yolu ile iki hücre arasındaki duyarlılık farkının daha net ortaya konulacağını kanaatindeyiz.

Lopez-Lastra ve ark.'nın (218), yaptıkları bir çalışmada geliştirdikleri RT-PZR metodunun, İPNV ile enfekte balık ve hücre hatlarından viral etkenin tespitindeki

duyarlılığını araştırmışlardır. Metodun 1 pg purifiye viral RNA'yı teşhis edebilecek kadar hassas olduğunu ve hücre kültürüne gerek kalmadan etkeni direkt olarak dokulardan tespit edebileceğini bildirmişlerdir. Blake ve ark.'nın (43), yürüttükleri bir araştırmada, etkeni teşhiş edebilmek için yeni bir RT-PZR modeli geliştirmişlerdir ve teste 4 farklı primer seti kullanmışlardır. 174 bp bant veren ve virusun NS-VP3 proteinlerini kodlayan bölgeden elde primerin İPNV'nun tüm serotiplerini identifiye edebildiğini bildirmişlerdir. Geliştirilen RT-PZR metodunun hassasiyeti 10² PFU/ml gibi yüksek bulunmuştur. Wang ve ark.'nın (366), İPN vrsn tespit etmek için yaptıkları bir çalışmada tek tüp kesintisiz RT-PZR yöntemini 15 fg virus partikülünü teşhiş edebilecek kadar hassas bulmuşlardır. Taksdal ve ark.'nın (347), RT-PZR ile virus izolasyon sonuçlarını karşılaştırdıkları bir çalışmada, 25 örnek grubunun 8'inde (%32) RT-PZR ile IPNV yönünden pozitiflik bulunurken, hücre kültürlerinde hiçbir pozitiflik elde edilememiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada, İPNV'nu teşhis etmek için yüksek hassasiyet ve zaman tasarrufu gibi avantajlarından dolayı RT-PZR yöntemi kullanılmış ve test 174 bp'lik bant veren primer seti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 20 işletmenin 10'u bu yöntemle İPNV genom varlığı pozitif bulunmuştur. Ayrıca RT-PZR pozitif örneklerden hücre kültürlerine inokulasyon yapılması sonucunda, BF-2 hücre hatlarında virus izolasyon sonuçları ile RT-PZR sonuçlarının birebir uyuştuğu gözlemlenmiştir. Fakat kullanılan hücre kültürü ve RT-PZR testi minimum teşhis limitleri hesaplanmamıştır.

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde 20 alabalık işletmesinde bazı viral etkenlerin araştırıldığı bu çalışmada, hiçbir işletmede İHNV ve EHNV genom varlığı tespit edilememiştir. Bölgede, daha önce öğüt ve ark.'nın (261), Albayrak ve ark.'nın (10) yaptıkları taramalarda İHNV'nun varlığı tespit edilememiştir. Yaptığımız çalışmanın bulguları bu çalışmaları doğrular nitelikte olup, önceki çalışmalarda bölgede EHNV taraması yapıldığına dair bir bulguya rastlanmamıştır. Bu iki virusun Avrupa ve Amerika'da yaygın olmasından dolayı yurtdışından yapılan balık ile yumurta alımlarında dikkatli olunması, hastalıktan ari işletmelerin seçilmesi ve alınan balık ile yumurtanın belli bir süre karantina altında tutulması gerekmektedir. Bahsedilen tedbirlerin, bu hastalıkların ülkemize girişinin engellenmesi bakımından son derece önemli olduklarını düşünmekteyiz.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doğu Karadeniz Bölgesindeki Alabalık Kuluçkahanelerinde ve Yavru Alabalıklarda Bazı Viral Etkenlerin Araştırılması başlıklı bu çalışmamızda, bölgede Artvin, Rize, Trabzon, Giresun, Ordu, Gümüşhane ve Bayburt illerinde kuluçkahanesi bulunan toplam 20 alabalık çiftliğinde yetiştirilen 3 ayrı alabalık türünden (gökkuşaağı, karadeniz ve kaynak alabalığı) yapılan toplam 2100 örneklemede VHSV, İHNV, İPNV ve EHNV etkenlerinin varlığı hücre kültürü ve RT-PZR yöntemiyle araştırılmıştır.

İşletmelerde VHSV, İHNV ve EHNV varlığı genom varlığı tespit edilemezken, 20 işletmenin 10'unda (%50) İPNV genom varlığı tespit edildi. Örneklerden, önce RT-PZR ile virus varlığı saptanıp, İPNV pozitif dokulardan BF-2 ve EPC hücre hatlarına inokulasyon yapıp, CPE oluşumu bakımından gözlemlendi. BF-2 hücre hattında tüm pozitif örneklerde CPE tespit edilirken, EPC hücre hattında 10 pozitif örneğin 5'inde CPE belirlendi ve BF-2 hücre hattının, İPNV izolasyon çalışmalarında EPC hücre hattına göre daha duyarlı olduğu saptandı. Elde edilen bulgular, RT-PZR ile virus izolasyon sonuçları arasında birebir uyum olduğunu gösterdi. Bu çalışmada, RT-PZR'nun balık dokularında İPNV varlığının ortaya konulmasında hızlı, güvenilir sonuç vermesi bakımından tercih edilmesi gereken bir teknik olduğu kanısına varılmıştır. Etken, araştırılan 20 alabalık işletmesinin 6'sında gökkuşaağı alabalıklarından, 3'ünde Karadeniz alabalıklarından izole edilirken bir işletmede kaynak alabalığından izole edildi. İPNV'nun iller arasındaki dağılımı ise istatistiki olarak önemsiz bulundu. Etkenin balıkların yaşlarına göre dağılımında, virüs 1-6 aylık balıklarda ortalama %65 oranında tespit edilirken, 11-12 aylık balıklarda %70 oranında tespit edildi.

İPN etkeninin işletmelere bulaşmasındaki en önemli faktörler, deniz kafesleri-baraj gölü kafesleri ve işletme arasındaki balık transfer döngüsü olarak gözlemlenmiştir. Hasat döneminde deniz ve baraj göllerindeki kafeslerde satılmayan balıkların tekrar işletmeye transferi hastalığın taşınmasında çok önemlidir. Bazı işletmelerin damızlık balık stoklarını da belirli dönemlerde baraj gölleri ile denizdeki kafeslerine transfer etmesi, ergin balıkların hastalık belirtisi göstermeden taşıyıcı olmasına ve akarsulardaki tesislere taşındıklarında horizontal yolla hastalığın diğer balıklara bulaşmasına neden olduğu düşünülmektedir. Çalışılan

işletmelerde virüsün bu kadar yaygın bulunmasında, işletmeler arasında kontrolsüz yumurta, yavru ve anaç transferlerinin olması, ülkenin her yerinden bölgeye yavru getirilmesi, aynı zamanda bu bölgeden de dışarıya transferler yapılmasının da rolü bulunmaktadır.

Viral etkenlerin bölgede varlığı ile yayılımını azaltmak için; gerekli yasal mevzuat hazırlanarak deniz ve barajlardaki kafesler ile çiftlikler arasındaki balık transferi döngüsünün ortadan kaldırılması, işletmeler arasındaki kontrolsüz yavru, yumurta ve balık transferlerinin engellenmesi, hastalıktan ari işletmeler kurulması ve canlı materyal teminin bu işletmelerden yapılması, enfekte çiftliklerin yeniden stoklandırılması, işletmelere yumurta ve ekipman dezenfeksiyonu eğitimi verilmesi, periyodik olarak tarama faaliyetlerinin yapılması, viral etkenlerin akarsu ve denizlerdeki doğal balıklarda yayılımının belirlenip elde edilen suşların kültürü yapılan balıklar üzerindeki patojenitesinin araştırılması, orta ve uzun vadede aşı geliştirme çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

9. 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. **Adelmann 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.
3. **Ahne W** (1978): Isolation and characterisation of infectious pancreatic necrosis virus from pike (*Esox lucius*). *Arch. Virol.*, **58**, 65–69.
4. **Ahne W** (1981): Serological Techniques Currently Used in Fish Virology, *Dev. Biol. Stand.*, 49, 327.
5. **Ahne W** (1982): Vergleichende Untersuchungen über die Stabilität von vier fischpathogenen Viren (VHSV, PFR, SVCV, IPNV). *Zentralbl. Veterinarmed* **29**:457–476.
6. **Ahne W, Bearzotti M, Bremont M, Essbauer S** (1998): Comparison of European systemic piscine and amphibian iridoviruses with epizootic haematopoietic necrosis virus and frog virus 3. *Zentralblatt für Veterinärmedizin (B)*, **45**, 373–383.
7. **Ahne W, Schlotfeldt HJ, Thomsen I** (1989): Fish viruses: isolation of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish (*Silurus glanis*). *Journal of Veterinary Medicine (B)* **36**, 333–336.
8. **Ahne W, Thomsen I** (1986): Infectious pancreatic necrosis: Detection of virus and antibodies in rainbow trout IPNV-carrier (*Salmo gairdneri*). *Zentralbl. Veterinarmed. B* **33**:552–554.
9. **Ahne W, Vestergard-Jorgensen PE, Olesen NJ, Fischer-Scherl T, Hoffmann R** (1989): Aquatic birnaviruses: Virus of the serogroup II isolated from an IPN outbreak in brook trout. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **9**:14–16
10. **Albayrak H, Özcan E** (2010): Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) infeksiyöz pankreatik nekrozis ve infeksiyöz

hematopoietik nekrozis virus enfeksiyonlarının varlığının araştırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **57**, 125-129.

11. **Alonso M, Rodriguez S, Perez-Prieto SI** (1999a): Nested PCR improves detection of infectious hematopoietic necrosis virus in cells coinfecting with infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol. Methods* **81**:1-9.
12. **Altuntaş C** (2007): Viral Hemorajik Septisemi (VHS) Virüsünün Trabzon, Yomra Koyunda Mezgit (*Merlangius merlangus euxinus*) Populasyonunda Yayılımı, Mevsimselliği ve Kültür Balıkçılığına Etkisinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
13. **Altuntaş C, Ögüt H** (2010): Monthly Occurrence and Prevalence of Viral Haemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) in Whiting *Merlangius merlangus*, *Diseases Of Aquatic Organisms*, **88**, 107-113.
14. **Amend DF** (1975): Detection and transmission of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout. *Journal of Wildlife Diseases* **11**, 471-478.
15. **Amend DF, Pietsch JP** (1972): Virucidal activity of two iodophors to salmonid viruses. *J. Fish. Res. Board Can.* **29**:61-65.
16. **Amend DF, Yasutake WT, Mead RW** (1969): A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon. *Transactions of the American Fisheries Society* **98**, 796-804.
17. **Anderson ED, Mourich DV, Fahrenkrug S, Leong JC** (1996a): Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **5**, 114-122.
18. **Anderson ED, Mourich DV, Leong JC** (1996b): Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following the intramuscular injection of DNA. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **5**, 105-113.
19. **Anonim.** (2011). İhbarı Mecburi Hayvan Hastalıkları. Erişim: (<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/01/20110122-4.htm>). Erişim tarihi: 17.12.2017.
20. **Aoki T, Takano T, Santos MD, Kondo H, Hirono I** (2008): Molecular innate immunity in teleost fish: review and future perspectives. In: Fisheries

for Global Welfare and Environment, Memorial Book of the 5th World Fisheries Congress. Terrapub, Tokyo, pp. 263–276.

21. **Arakawa CK, Deering RE, Higman KH, Oshima KH, O'Hara PJ, Winton JR** (1990): Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a nucleoprotein gene sequence of infectious hematopoietic necrosis virus. *Diseases of Aquatic Organisms* **8**, 165–170.
22. **Ariel E, Jensen BB** (2009): Challenge studies of European stocks of redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with epizootic haematopoietic necrosis virus. *Journal of Fish Diseases* **32**, 1017–1025.
23. **Ariel E, Olesen NJ** (2002): Finfish in aquaculture and their diseases: A retrospective view of the European Community. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **22**:72–85.
24. **Ariel E, Owens L, Moody NJG** (1995): A barramundi bioassay for iridovirus refractory to cell culture. In: Shariff, R.P., Subasinghe, R.P. and Arthur, J.R. (eds) *Diseases in Asian Aquaculture II. Fish Health Section*. Asian Fisheries Society, Manila, pp. 355–367.
25. **Arkush KD, Mendonca HL, McBride AM, Hedrick RP** (2004): Susceptibility of captive adult winter-run chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* to waterborne exposures with infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Diseases of Aquatic Organisms* **59**, 211–216.
26. **Arkush KD, Mendonca HL, McBride AM, Yun S, McDowell TS, Hedrick RP** (2006): Effects of temperature on infectivity and of commercial freezing on survival of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Dis. Aquat. Org.* **69**, 145–151.
27. **Armstrong R, Robinson J, Rymes C, Needham T** (1993): Infectious hematopoietic necrosis in Atlantic salmon in British Columbia. *Canadian Veterinary Journal* **34**, 312–313.
28. **Arnheiter H, Meier E** (1990): Mx proteins: antiviral proteins by chance or by necessity? *The New Biologist* **2**, 845–857
29. **Azumi K, Yoshimizu M, Suzuki S, Ezura Y, Yokosawa H** (1990): Inhibitory effect of halocyanine, an antimicrobial substance from ascidian

hemocytes, on the growth of fish viruses and marine bacteria. *Experimentia* **46**: 1066–1067

30. **Bahar MW, Sarin LP, Graham SC, Pang J, Bamford DH, et al.** (2013): Structure of a VP1-VP3 complex suggests how birnaviruses package the VP1 polymerase. *Journal of Virology* **87**, 3229–3236.
31. **Bain MB, Cornwell ER, Hope KM, Eckerlin GE, Casey RN, Groocock GH, et al.** (2010): Distribution of an invasive aquatic pathogen (viral hemorrhagic septicemia virus) in the Great Lakes and its relationship to shipping. *PloS One* **5**, e10156.
32. **Bang Jensen B, Ersboll AK, Ariel E** (2009): Susceptibility of pike *Esox lucius* to a panel of ranavirus isolates. *Dis. Aquat. Org.*, **83**, 169–179.
33. **Barja JL, Toranzo AE, Lemos ML, Hetrick FM** (1983): Influence of water temperature and salinity on the survival of IPN and IHN viruses. *Bulle. Euro. Assoc. Fish Patholog.* **3**:47–50.
34. **Barlic-Maganja D, Strancar M, Hostnik P, Jencic V, Grom J** (2002): Comparison of the efficiency and sensitivity of virus isolation and molecular methods for routine diagnosis of infectious haematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Fish Diseases* **25**, 73–80.
35. **Batts B, Winton J** (2002): Expanded host and geographic ranges for North American VHSV: genetic analysis of new isolates. Fifth International Symposium for Viruses of Lower Vertebrates, Seattle, Washington, Abstract Book, P-43, 27–30 August, 2002.
36. **Baudonuy AM, Castric J** (1977): Persistence du pouvoir pathogene du virus de la necrose pancreatique infectieuse apres un sejour prolonge dans l'eau. *Bull. Off. Int. Epizoot.* **87**:409–413.
37. **Becker JA, Tweedie A, Gilligan D, Asmus M, Whittington RJ** (2013): Experimental infection of Australian freshwater fish with *Epizootic haematopoietic necrosis virus* (EHNV). *Journal of Aquatic Animal Health* **25**, 66–76.
38. **Bejar J, Borrego JJ, Alvarez MC** (1997): A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head seabream (*Sparus aurata*, L.). *Aquaculture* **150**:143–153.

39. **Bergmann SM, Fichtner D, Skall HF, Schlotfeldt HJ, Olesen NJ** (2003): Age- and weight- dependent susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to isolates of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) of varying virulence. *Diseases of Aquatic Organisms* **55**, 205–210.
40. **Bernard J, de Kinkelin P, Bearzotti-Le B M** (1983): Viral Hemorrhagic Septisemia of Rainbow Trout: Relation Between The G Polypeptide and Antibody Production in Protection of The Fish After infection with The F25 Attenuated Variant. *Infection and Immunity*, **39**, 7–14.
41. **Bigarre L, Cabon J, Baud M, Pozet F, Castric J** (2008): Ranaviruses associated with high mortalities in catfish in France. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **28**, 163–168.
42. **Blake SL, Ma JY, Caporale DA, Jairath S, Nicholson BL** (2001): Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Dis. Aquat. Org.* **45**:89–102.
43. **Blake SL, Schill WB, McAllister PE, Lee MK, Singer JT, Nicholson BL** (1995): Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 835–839.
44. **Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LE** (2001): Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.* **25**, 853–873.
45. **Bootland LM, Dobos P, Stevenson RMW** (1995): Immunization of adult brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchell), fails to prevent the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) carrier state. *Journal of Fish Diseases* **18**:449–458
46. **Bootland LM, Leong J** (1999): Infectious hematopoietic necrosis virus. In: Woo, P.T.K. and Bruno, D.W. (eds) *Fish Diseases and Disorders Viral Bacterial and Fungal Infections*, Volume 3. CAB International, Wallingford, UK, pp. 57–121.
47. **Bootland LM, Lorz HV, Rohovec JS, Leong JC** (1994): Susceptibility of brook trout to infectious hematopoietic necrosis virus Types 1 and 2. *Journal of Aquatic Animal Health* **6**, 144–148.

48. **Bowden TJ** (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 Dis.* **26**, 207–212.
49. **Bowden TJ, Smail DA, Ellis AE** (2002): Development of a reproducible infectious pancreatic necrosis virus challenge model for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **25**, 555–563.
50. **Bruchhof B, Marquardt O, Enzmann RJ** (1995): Differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses by reverse transcriptase-dependent polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* **55**, 111–119.
51. **Brudeseth B, Raynard R, King J, Evensen Ø** (2005): Sequential pathology after experimental infection with marine viral hemorrhagic septicemia virus isolates of low and high virulence in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Vet. Pathol.* **42**, 9–18.
52. **Brudeseth BE, Castric J, Evensen O** (2002): Studies on pathogenesis following single and double infections with viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Pathology* **39**, 180–189.
53. **Brunson R, True K, Yancey J** (1989): VHS Virus Isolated at Makah National Fish Hatchery. *American Fisheries Society Fish Health Section Newsettler*, 17, 3–4.
54. **Bryan LK, Baldwin CA, Gray MJ, Miller DL** (2009): Efficacy of select disinfectants at inactivating ranavirus. *Diseases of Aquatic Organisms* **84**, 89–94.
55. **Burke J, Grischkowsky R** (1984): An epizootic caused by infectious hematopoietic necrosis virus in an enhanced population of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), smolts at Hidden Creek, Alaska. *Journal of Fish Diseases* **7**, 421–429.
56. **Byon JY, Ohira T, Hirono I, Aoki T** (2006): Comparative immune responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* after vaccination with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) recombinant glycoprotein and DNA vaccine using a microarray analysis. *Vaccine* **24**, 921–930.

57. **Byrne N, Castric J, Lamour F, Cabon J, Quentel C** (2008): Study of the viral interference between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology* **24**, 489–497.
58. **Cain KD, LaPatra SE, Baldwin TJ, Shewmaker B, Jones J, Ristow SS** (1996): Characterization of mucosal immunity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* challenged with infectious hematopoietic necrosis virus: identification of antiviral activity. *Diseases of Aquatic Organisms* **27**, 161–172.
59. **Calvert JG, Nagy E, Soler M, Dobos P** (1991): Characterization of the VPg-dsRNA linkage of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* **2**:2563–2567.
60. **Candan A** (2002): First report on the diagnosis of infectious pancreatic necrosis (IPN) based on reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **22**, 45–48.
61. **Castric J, Baudin-Laurencin F, Coustans MF, Auffret M** (1987): Isolation of infectious pancreatic necrosis virus, Ab serotype, from an epizootic in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* **67**:117–126.
62. **Castric J, Jeffroy J** (1991): Experimentally induced diseases in marine fish with IHNV and a rhabdovirus of eel. In: *Aquaculture and the Environment. European Aquaculture Society, International Conference Aquaculture Europe '91, Dublin, Ireland, 10–12 June 1991*. pp. 54–55.
63. **Center for Food Security and Public Health (CFSPH)** (2003): Viral Hemorrhagic Septicemia, Institute for International Cooperation in Animal Biologocs and Collage of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa, 3.
64. **Chen MF, Aikens CM, Fryer JL, Rohovec JS** (1990): Virulence of four isolates of infectious hematopoietic necrosis virus in salmonid fishes and comparative replication in salmonid cell lines. *California Fish and Game* **76**, 137–145.

65. **Chen SN, Kou GH, Hedrick RP, Fryer JL** (1985): The occurrence of viral infections of fish in Taiwan. In: Ellis, A.E. (ed.) *Fish and Shellfish Pathology*. Academic Press, New York, pp. 313–319.
66. **Chevassus B, Dorson M** (1990): Genetics of resistance to disease in fishes. *Aquaculture*, **85**, 83–107.
67. **Chinchar VG, Yu KH, Jancovich JK** (2011): The molecular biology of *Frog Virus 3* and other iridoviruses infecting cold-blooded vertebrates. *Viruses* **3**, 1959–1985.
68. **Corbeil S, Kurath G, LaPatra SE** (2000b): Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various routes of immunization. *Fish and Shellfish Immunology* **10**, 711–723.
69. **Corbeil S, LaPatra SE, Anderson ED, Jone J, Vincent B, Hsu YL, Kurath G** (1999): Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* using DNA vaccines. *Diseases of Aquatic Organisms* **39**, 29–36.
70. **Corbeil S, LaPatra SE, Anderson ED, Kurath G** (2000a): Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous strains of infectious hematopoietic necrosis virus. *Vaccine* **18**, 2817–2824.
71. **Coulibaly F, Chevalier C, Delmas B, Rey FA** (2010): Crystal structure of an aquabirnavirus particle: insights into antigenic diversity and virulence determinism. *Journal of Virology* **84**(4), 1792–1799.
72. **Crane MSJ, Young J, Williams L** (2005): Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV): growth in fish cell lines at different temperatures. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **25**, 228–231.
73. **Cuesta A, Tafalla C** (2009): Transcription of immune genes upon challenge with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in DNA vaccinated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vaccine*, **27**, 280–289.
74. **Dale OB, Orpetveit I, Lyngstad TM, Kahns S, Skall HF, Olesen NJ, et al.** (2009): Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in seawaterfarmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus genotype III. *Dis. Aquat. Organ.* **85**, 93–103.

75. **Das B, Urquhart K, Ellis A, Collet B** (2008): Induction of Mx protein in Atlantic cod with poly I:C: immuno-cross reactive studies of antibodies to Atlantic salmon Mx with Atlantic cod. *Fish Shellfish Immunol.* **25**, 321–324.
76. **Das BK, Nayak BB, Fourrier M, Collet B, Snow M, Ellis AE** (2007): Expression of Mx protein in tissues of Atlantic salmon post-smolts – an immunohistochemical study. *Fish and Shellfish Immunology* **23**, 1209–1217.
77. **De Kinkelin P** (1988): Vaccination against viral haemorrhagic septicaemia. In: Ellis, A.E. (Ed.), *Fish Vaccination*. Academic Press, London, pp. 172–192.
78. **De Kinkelin P, Bearzotti M, Castric J, Nougayrede P, Lecocq-Xhonneux F, Thiry M** (1995): Eighteen years of vaccination against viral haemorrhagic septicaemia in France. *Vet. Res.* **26**, 379–387.
79. **De Kinkelin P, Bearzotti-Le B M, Bernard J** (1980): Viral Hemorrhagic Septisemia of Rainbow Trout Selection of A Thermoresistant Virus Variant and Comparison of Polypeptide Synthesis with The Wild-Type Virus Strain. *Journal of Virology*, **36**, 652-658.
80. **De Kinkelin P, Castric J** (1982): An Experimental Study of The Susceptibility of Atlantic Salmon Fry (*Salmo salar*) to Viral Hemorrhagic Septicemia. *Journal of Fish Diseases*, **5**, 57–65.
81. **De Las Heras AI, Prieto SIP, Saint-Jean SR** (2009): In vitro and in vivo immune responses induced by a DNA vaccine encoding the VP2 gene of the infectious pancreatic necrosis virus. *Fish Shellfish Immunol* **27**: 120–29.
82. **De las Heras AI, Rodriguez Saint-Jean S, Perez-Prieto SI** (2008): Salmonid fish viruses and cell interactions at early steps of the infective cycle. *Journal of Fish Diseases* **31**, 535–546.
83. **De las Heras AI, Saint-Jean SR, Pérez-Prieto SI** (2010): Immunogenic and protective effects of an oral DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in fish. *Fish & Shellfish Immunology* **28**: 562-570.
84. **Delmas B, Kibenge FSB, Leong JC, Mundt E, Vakharia VN, Wu JL** (2005): Family Birnaviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L.A. (eds) *Virus Taxonomy. Eighth Report*

85. **Desautels D, Mac Kelvie RM** (1975): Practical aspects of survival and destruction of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish. Res. Board Can.* **32**:523–531.
86. **Dhar AK, Bowers RM, Licon KS, LaPatra SE** (2008): Detection and quantification of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by SYBR Green real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* **147**, 157–166.
87. **Dixon RF, Hill BJ** (1984): Rapid detection of fish rhabdoviruses by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aquaculture* **42**, 1–12.
88. **Dobos P, Rowe D** (1977): Peptide map comparison of infectious pancreatic necrosis virus-specific polypeptides. *J. Virol.* **24**: 805–820.
89. **Dopazo CP, Barja JL** (2002): Diagnosis and identification of IPNV in salmonids by molecular methods. In “Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases” (C. O. Cunningham, ed.), pp. 23–48. Kluwer Academic, Publishers, Amsterdam.
90. **Dorson M** (1977): Vaccination trials of rainbow trout fry against infectious pancreatic necrosis. *Bull. Off. Epizoot.* **87**:405.
91. **Dorson M** (1982): Infectious pancreatic necrosis of salmonids: Present status of knowledge concerning the viruses and the possibilities of controlling the disease. *Bull. Franc. Piscicult.* **305**:61–66.
92. **Dorson M, Castric J, Torchy C** (1978): Infectious pancreatic necrosis virus of salmonids: Biological and antigenic features of a pathogenic strain and a non-pathogenic variant selected in RTG-2 cells. *J. Fish Dis.* **1**:309–320.
93. **Dorson M, Chevassus B, Torchy C** (1991): Comparative susceptibility of three species of char and of rainbow trout x char triploid hybrids to several pathogenic salmonid viruses. *Diseases of Aquatic Organisms* **11**, 217–224.
94. **Dorson M, Michel C** (1987): An evaluation of the activity of five quaternary ammonium compounds on main viruses and bacteria pathogenic for salmonids. *Bull. Franc. Piscicult.* **305**:61–66.
95. **Dorson M, Quillet E, Hollebecq MG, Torhy C, Chevassus B** (1995): Selection of rainbow trout resistant to viral haemorrhagic septicaemia virus and transmission of resistance by gynogenesis. *Vet. Res.* **26**, 361–368.

96. **Dorson M, Torchy C** (1981): The influence of fish age and water temperature on mortalities of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, caused by a European strain of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.* **4**:213–221.
97. **Drolet BS, Rohovec JS, Leong JC** (1994): The route of entry and progression of infectious hematopoietic necrosis virus in *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): a sequential immunohistochemical study. *Journal of Fish Diseases* **17**, 337–347.
98. **Eaton BT, Hyatt AD, Hengstberger S** (1991): Epizootic haematopoietic necrosis virus – purification and classification. *Journal of Fish Diseases* **14**, 157–169.
99. **Einer-Jensen K, Ahrens P, Lorenzen N** (2006): Genetic stability of the VHSV consensus sequence of G-gene in diagnostic samples from an acute outbreak. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **26**, 62.
100. **Einer-Jensen K, Winton J, Lorenzen N** (2005): Genotyping of The Fish Rhabdovirus, Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus, by Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Veterinary Microbiology*, **106**, 167–178.
101. **Ellis A** (2001): Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* **25**, 827–839.
102. **Elston RA, Meyers TR** (2009): Effect of viral hemorrhagic septicemia virus on Pacific herring in Prince William Sound, Alaska, from 1989 to 2005. *Dis. Aquat. Organ.* **83**, 223–246.
103. **Engelking HM, Kaufman J** (1994): Brown trout (*Salmo trutta*) loss to infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Fish Health Section, American Fisheries Society Newsletter* **22**, 20–22.
104. **Engelking HM, Leong JC** (1989): The glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus elicits neutralizing antibody and protective responses. *Virus Research* **3**, 213–230.
105. **Engelking HM, Leong JC** (1989b): Glycoprotein from infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) induces protective immunity against five IHNV types. *Journal of Aquatic Animal Health* **1**, 291–300.

106. **Enzmann PJ, Konrad M, Rapp J** (1992): Epizootiological studies on viral haemorrhagic septicaemia in brown trout *Salmo trutta fario*. *Dis. Aquat. Organ.* **12**, 143–146.
107. **Enzmann PJ, Kurath G, Fichtner D, Bergmann SM** (2005): Infectious hematopoietic necrosis virus: monophyletic origin of European IHNV isolates from North American genogroup M. *Diseases of Aquatic Organisms* **66**, 187–195.
108. **Espinoza JC, Farias G, Soler M, Kuznar J** (1985): Identity between infectious pancreatic necrosis virus VR-299 and a Chilean isolate. *Intervirology* **24**:58–60
109. **Evensen Ø, Meier W, Wahli T, Olesen N, Vestergård Jørgensen P, Håstein T** (1994): Comparison of immunohistochemistry and virus cultivation for detection of viral haemorrhagic septicaemia virus in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Organ.* **20**, 101–109.
110. **Farias G, Navarrete E, Kiss J, Kuznar J** (1988): Effect of ammonium chloride on the multiplication of infectious pancreatic necrosis virus. *Arch. Virol.* **98**:155–162.
111. **Feldman AR, Lee J, Delmas B, Paetzel M** (2006): Crystal structure of a novel viral protease with a serine/lysine catalytic dyad mechanism. *Journal of Molecular Biology* **358**,1378–1389.
112. **Fernandez-Trujillo A, Ferro P, Garcia-Rosado E, Infante C, Alonso MC, Bejar J, Borrego JJ, Manchado M** (2008a): Poly I:C induces Mx transcription and promotes an antiviral state against sole aquabirnavirus in the fl atfi sh Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Fish and Shellfish Immunology* **24**, 279–285.
113. **Follett JE, Meyers TR, Burton TO, Geesin JL** (1997): Comparative susceptibilities of salmonid species in Alaska to infectious hematopoietic virus (IHNV) and North American viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *J. Aquat. Anim. Health*, **9**, 34–40.
114. **Follett JE, Schmitt MK** (1990): Characterization of a cell line derived from inconnu. *Journal of Aquatic Animal Health* **2**, 61–67.

115. **Foott JS, Free D, McDowell TS, Arkush KD, Hedrick RP** (2006): Infectious hematopoietic necrosis virus transmission and disease among juvenile chinook salmon exposed in culture compared to environmentally relevant conditions. *San Francisco Estuary and Watershed Science* **4**, 1–16.
116. **Frantsi C, Savan M** (1971a): Infectious Pancreatic Necrosis Virus — Temperature And Age Factors In Mortality. *Journal Of Wildlife Diseases*, **7(4)**:249-255.
117. **Frantsi C, Savan M** (1971): Infectious pancreatic necrosis virus: Comparative frequencies of isolation from feces and organs of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Fish Res. Board Can.* **28**,1064–1065.
118. **Fregeneda-Grandes JM, Olesen NJ** (2007): Detection of rainbow trout antibodies against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) by neutralisation test is highly dependent on the virus isolate used. *Dis. Aquat. Organ.* **74**, 151–158.
119. **Frost P, Ness A** (1997): Vaccination of Atlantic salmon with recombinant VP2 of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), added to a multivalent vaccine, suppresses viral replication following IPNV challenge. *Fish Shellfish Immunol.* **7**,609–619.
120. **Garver KA, Hawley LM, McClure CA, Schroeder T, Aldous S, Doig F, et al.** (2011): Development and validation of a reverse transcription quantitative PCR for universal detection of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis. Aquat. Organ.* **95**, 97–112.
121. **Ghittino P** (1965): Viral hemorrhagic septicemia (VHS) in rainbow trout in Italy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **126**, 468–478.
122. **Ghittino P, Schwedler H, De Kinkelin P** (1984): The principal infectious diseases of fish and their general control methods. In “Symposium on Fish Vaccination” (P. de Kinkelin, ed.), pp. 5–38. Office International des Epizooties, Paris, France.
123. **Gobbo F, Cappellozza E, Pastore MR, Bovo G** (2010): Susceptibility of black bullhead *Ameiurus melas* to a panel of ranavirus isolates. *Diseases of Aquatic Organisms* **90**, 167–174.

124. **Goldes SA, Mead SL** (1992): Susceptibility of brook trout *Salvelinus fontinalis* to infectious hematopoietic necrosis virus. *Fish Health Section, American Fisheries Society Newsletter* 20, 4.
125. **Graham SC, Sarin LP, Bahar MW, Myers RA, Stuart DI, et al.** (2011): The N-terminus of the RNA polymerase from infectious pancreatic necrosis virus is the determinant of genome attachment. *PLoS Pathogens* 7(6): e1002085.
126. **Grayfer L, Andino FD, Chen GC, Chinchar GV, Robert J** (2012): Immune evasion strategies of ranaviruses and innate immune responses to these emerging pathogens. *Viruses* 4, 1075–1092.
127. **Gregory A** (2008): A qualitative assessment of the risk of introduction of viral haemorrhagic septicaemia virus into the rainbow trout industry Scotland, Fisheries Research Services Internal Report.
128. **Groocock GH, Getchell RG, Wooster GA, Britt KL, Batts WN, Winton JR, et al.** (2007): Detection of viral hemorrhagic septicemia in round gobies in New York State (USA) waters of Lake Ontario and the St. Lawrence River. *Dis. Aquat. Organ.* 76, 187–192.
129. **Gurcay M, Turan T, Parmaksız A** (2013): Türkiye’de Kültürü Yapılan Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis Virus Varlığının Tespiti Üzerine Bir Araştırma. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 19 (1): 141-146.
130. **Hansen JD, LaPatra S** (2002): Induction of the rainbow trout MHC class I pathway during acute IHNV infection. *Immunogenetics* 54, 654–661.
131. **Harmache A, LeBerre M, Droineau S, Giovannini M, Bremont M** (2006): Bioluminescence imaging of live infected salmonids reveals that the fin bases are the major portal of entry for *Novirhabdovirus*. *Journal of Virology* 80, 3655–3659.
132. **Hattenberger-Baudouy AM, Danton M, Merle G, Torchy C, de Kinkelin P** (1989): Serological evidence for infectious hematopoietic necrosis in rainbow trout from a French outbreak of disease. *Journal of Aquatic Animal Health* 1, 126–134.

133. **Hawley LM, Garver KA** (2008): Stability of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in freshwater and seawater at various temperatures. *Dis. Aquat. Org.* **82**, 171–178.
134. **He M, Ding NZ, He CQ, Yan XC, Teng CB** (2013): Dating the divergence of the infectious hematopoietic necrosis virus. *Infection, Genetics and Evolution* **18**, 145–150.
135. **Hedrick RP, LaPatra SE, Fryer JL, McDowell T, Wingfield WH** (1987): Susceptibility of coho (*Oncorhynchus kisutch*) and chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) salmon hybrids to experimental infections with infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **7**, 97–100.
136. **Helmick CM, Bailey FJ, LaPatra S, Ristow S** (1995a): Histological comparison of infectious hematopoietic necrosis virus challenged juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and coho salmon *O. kisutch* gill, esophagus/cardiac stomach region, small intestine and pyloric caeca. *Diseases of Aquatic Organisms* **23**, 175–187.
137. **Helmick CM, Bailey FJ, LaPatra S, Ristow S** (1995b): The esophagus/cardiac stomach region: site of attachment and internalization of infectious hematopoietic necrosis virus in challenged juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and coho salmon *O. kisutch*. *Diseases of Aquatic Organisms* **23**, 189–199.
138. **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
139. **Hershberger PK, Kocan RM, Elder NE, Meyers TR, Winton JR** (1999): Epizootiology of Viral Hemorrhagic Septisemia Virus in Pacific Herring from TheSpawn-On-Kelp Fishery in Prince William Sound, Alaska, USA. *Diseases of Aquatic Organisms*, **37**, 23–31.
140. **Hill BJ** (1992): Impact of viral diseases of salmonid fish in the European community. In: Kimura, T. (ed.) *Proceedings of the OJI International*

Symposium on Salmonid Diseases. Hokkaido University Press, Sapporo, Japan, pp. 48–59.

141. **Hill BJ, Dorson M, Dixon PF** (1980): Studies on immunization of trout against IPN. In “Fish Diseases” (W. Ahne, ed.), pp. 29–36. Third COPRAQ Session, Springer- Verlag, Berlin.
142. **Hill BJ, Way K** (1995): Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. *Annu. Rev. Fish Dis.* **5**, 55–77.
143. **Holopainen R, Honkanen J, Jensen BB, Ariel E, Tapiovaara H** (2011): Quantitation of ranaviruses in cell culture and tissue samples. *Journal of Virological Methods* **171**, 225–233.
144. **Hope KM, Casey RN, Groocock GH, Getchell RG, Bowser PR, Casey JW** (2010): Comparison of quantitative RT-PCR with cell culture to detect viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) IVb infections in the Great Lakes. *J. Aquat. Anim. Health* **22**, 50–61.
145. **Hopper K** (1989): The Isolation of VHSV from Chinook Salmon at Glenwood Springs, Orcas Island, Washington. *Fisheries Society Fish Health Section Newsettler*, **17**, 1.
146. **Huber P, Petri B, Allen S, Lumsden J** (2010): Viral haemorrhagic septicaemia virus IVb inactivation by ultraviolet light, and storage viability at 4 and – 20°C. *J. Fish Dis.* **33**, 377–380.
147. **Hussinee L, Huber P, Russell S, Lepage V, Reid A, Young KM, et al.** (2010): Viral haemorrhagic septicaemia virus IVb experimental infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and fathead minnow, *Pimephales promelas* (Rafinesque). *J. Fish Dis.* **33**, 347–360.
148. **Hyatt AD, Gould AR, Zupanovic Z, Cunningham AA, Hengstberger S, et al.** (2000): Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Archives of Virology* **145**, 301–331.
149. **ICTV** (2014): *Virus Taxonomy: 2014 Release*. Available as *Virus Taxonomy: 2015 Release* at: http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?src=NCBI&ictv_id=19810087 (accessed 21 October 2016).

150. **Inouye K, Ikeya F, Yamazaki T, Hara T** (1990): Virucidal activities of various germicides to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish Pathol.* **25(2)**:81–86.
151. **Isshiki T, Nagano T, Kanehira K, Suzuki S** (2004): Distribution of marine birnavirus in cultured marine fish species from Kagawa prefecture, Japan. *Journal of Fish Diseases* **27**, 89-98.
152. **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.
153. **Işıdan H, Bolat Y** (2011): A Survey of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **11**, 507-513.
154. **Jancovich JK, Bremont M, Touchman JW, Jacobs BL** (2010): Evidence for multiple recent host species shifts among the ranaviruses (Family *Iridoviridae*). *Journal of Virology* **84**, 2636–2647.
155. **Jancovich JK, Chinchar VG, Hyatt A, Miyazaki T, Williams T, Zhang QY** (2012): Family *Iridoviridae*. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. (eds) *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press, San Diego, California, pp. 193–210.
156. **Jancovich JK, Steckler NK, Waltzek TB** (2015): Ranavirus taxonomy and phylogeny. In: Gray, M.J. and Chinchahr, V.G (eds) *Ranaviruses: Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates*. Springer, Cham, Switzerland, pp. 59–70.
157. **Jarp J, Gjevne AG, Olesen AB, Bruheim T** (1994): Risk factors for furunculosis, infectious pancreatic necrosis and mortality in post-smolt of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *J. Fish Dis.* **18**,67–78.
158. **Jarp J, Melby H** (1997): A prospective study of infectious pancreatic necrosis in farmed Atlantic salmon post-smolt. In: *Proceedings of the Eighth International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics*. Epidemiologie et Sante Animale, Paris, pp. 31-32.

159. **Jencic V, Hostnik P, Barlia-maganja D, Grom J** (2002): The spread of salmonid viral diseases in Slovenia. *Slovenian Veterinary Research* **39**, 179–205.
160. **Jensen BB, Ersboll AK, Ariel E** (2009): Susceptibility of pike *Esox lucius* to a panel of ranavirus isolates. *Diseases of Aquatic Organisms* **83**, 169–179.
161. **Jensen BB, Holopainen R, Tapiovaara H, Ariel E** (2011): Susceptibility of pike-perch *Sander lucioperca* to a panel of ranavirus isolates. *Aquaculture* **313**, 24–30.
162. **Jensen MH** (1963): Preparation of Fish Tissue Cultures for Virus Research. *Bulletin de L'Office International des Epizootes*, **59**, 131–134.
163. **Jensen MH** (1965): Research on the virus of Egtved disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* **126**, 422–426.
164. **Jensen NJ, Bloch B, Larsen JL** (1979): The Ulcus-Syndrome in Cod (*Gadus morhua*) III, A Preliminary Virological Report. *Nordisk Veterinærmedicin*, **34**, 136–142.
165. **Johansen LH, Sommer AI** (1995): In vitro studies of infectious pancreatic necrosis virus infections in leukocytes isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* **132**, 91–95.
166. **Jonstrup SP, Kahns S, Skall HF, Boutrup TS, Olesen NJ** (2013): Development and validation of a novel Taqman-based real-time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Fish Dis.* **36** (1), 9–23.
167. **Jørgensen PEV** (1980): Egtved Virus: The Susceptibility of Brown Trout and Rainbow Trout to Eight Virus Isolates and The Significance of The Findings for The VHS Control, Pages 37 in W. Ahne, ed. *Fish Diseases*. Third COPRAQSession. SpringerVerlag, Berlin, Heidelberg, New York
168. **Jørgensen PEV** (1982): Egtved virus: temperature-dependent immune response of trout to infection with low-virulence virus. *J. Fish Dis.* **5**, 47–55.
169. **Jørgensen PEV, Bregnballe F** (1969): Infectious pancreatic necrosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Denmark. *Nord. Vet. Med.* **21**, 142–148.

170. **Jørgensen PEV, Olesen NJ** (1987): Cod Ulcus Syndrom Rhabdovirus is Indistinguishable from The Egtved (VHS) Virus. *Bulletin of The European Association of Fish Pathologists*, **7**, 73–74.
171. **Jung SJ, Kim SR, Joung IY, Kitamura S, Cheong HT, Oh MJ** (2008): Distribution of marine birnavirus in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Journal of Microbiology* **46**, 265–273.
172. **Kalaycı G, İncöğlü S, Özkan B** (2006): First Isolation of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) Virus from Turbot (*Scophthalmus maximus*) Cultured in The Trabzon Coastal Area of The Black Sea in Turkey. *B. Eur. Ass. Fish Path.* **26** (4), 157–162.
173. **Kalaycı G, İncöğlü Ş, Özyer BÖ, Küçükali Y** (2012): Türkiye’de İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis ve Viral Hemorajik Septisemi Hastalıklarının Durumu. *Bornova Vet. Bil. Derg.* **34** (48), 31–38.
174. **Kane-Sutton M, Kinter B, Dennis PM, Koonce JF** (2010): Viral hemorrhagic septicemia virus infection in yellow perch, *Perca flavescens*, in Lake Erie. *J. Great Lakes Res.* **36**, 37–43.
175. **Kelly RK, Nielsen O** (1993): Comparative serology of three recent Canadian isolates of aquatic birnavirus. *Fish Pathol.* **28**, 161–164.
176. **Kerr CRC, Cunningham CO** (2006): Moving molecular diagnostics from laboratory to clinical application: a case study using infectious pancreatic necrosis virus serotype A. *Letters in Applied Microbiology* **43**, 98–104.
177. **Khoo SK, Ozaki A, Nakamura F, Arakawa T, Ishimoto S** (2004): Identification of a novel chromosomal region associated with IHNV resistance in rainbow trout. *Fish Pathology* **39**, 95–102.
178. **Kim CH, Johnson MC, Drennan JD, Simon BE, Thomann E, Leong JC** (2000): DNA vaccines encoding viral glycoproteins induce non-specific immunity and Mx protein synthesis in fish. *Journal of Virology* **74**, 7048–7054.
179. **Kim R, Faisal M** (2010): Comparative susceptibility of representative Great Lakes fish species to the North American viral hemorrhagic septicemia virus sublineage IVb. *Dis. Aquat. Organ.* **91**, 23–34.

180. **King JA, Snow M, Smail DA, Raynard RS** (2001): Distribution of viral haemorrhagic septicaemia virus in wild fish species of the North Sea, North east Atlantic Ocean and Irish Sea. *Dis. Aquat. Organ.* **47**, 81–86.
181. **Knott R, Munro A** (1986): The persistence of IPNV in Atlantic salmon. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**,359–364.
182. **Knusel R, Bergmann SM, Einer-Jensen K, Casey J, Segner H, Wahli T** (2007): Virus isolation vs RTPCR: which method is more successful in detecting VHSV and IHNV in fish tissue sampled under field conditions? *Journal of Fish Diseases* **30**, 559–568.
183. **Kocan R, Bradley M, Elder N, Meyers T, Batts W, Winton J** (1997): North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus is highly pathogenic for laboratory-reared Pacific herring. *J. Aquat. Anim. Health*, **9**, 279–290.
184. **Krogstad J, Hastein T, Ronningen K** (1989): Infectious pancreatic necrosis virus in Norwegian fish farms. In “Viruses of Lower Vertebrates” (W. Ahne and E. Kurstak, eds.), pp. 284–291. Springer Verlag, Berlin.
185. **Kudo S, Kurosawa D, Kunimemi I, Nobusawa K, Kobayashi S** (1973): Electron microscopic observations of the pancreas and liver in the fingerling rainbow trout with symptoms of IPN. *Jpn. J. Ichthyol.* **20**,163–177.
186. **Kurath G, Garver KA, Corbeil S, Elliott DG, Anderson ED, LaPatra SE** (2006): Protective immunity and lack of histopathological damage two years after DNA vaccination against infectious hematopoietic necrosis virus in trout. *Vaccine* **24**, 345–354.
187. **Kurath G, Garver KA, Troyer RM, Emmenegger EJ, Einer-Jensen K, Anderson ED** (2003): Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in North America. *Journal of General Virology* **84**, 803–814.
188. **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.
189. **Kurita J, Nakajima K** (2012): Megalocytiviruses. *Viruses* **4**, 521–538.

190. **Kusuda R, Nishi Y, Hosono N, Suzuki S** (1993): Serological comparison of birnavirus isolated from several species of marine fish in south-west Japan. *Fish Pathology* **28**, 91-92.
191. **Kuzmin IV, Novella IS, Dietzgen RG, Padhi A, Rupprecht CE** (2009): The rhabdoviruses: Biodiversity, phylogenetics, and evolution. *Infection, Genet Evol.* **9**, 541–553.
192. **La Fauce K, Ariel E, Munns S, Rush C, Owens L** (2012): Influence of temperature and exposure time on the infectivity of *Bohle iridovirus*, a ranavirus. *Aquaculture* **354**, 64–67.
193. **Landis ED, Purcell MK, Thorgaard GH, Wheeler PA, Hansen JD** (2008): Transcriptional profiling of MHC class I genes in rainbow trout infected with infectious hematopoietic necrosis virus. *Molecular Immunology* **45**, 1646–1657.
194. **Langdon JS** (1989): Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. *Journal of Fish Diseases* **12**, 295–310.
195. **Langdon JS, Humphrey JD** (1987): Epizootic haematopoietic necrosis, a new viral disease in redfin perch *Perca fluviatilis* L. in Australia. *Journal of Fish Diseases* **10**, 289–298.
196. **Langdon JS, Humphrey JD, Williams LM** (1988): Outbreaks of an EHNV-like iridovirus in cultured rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Australia. *Journal of Fish Diseases* **11**, 93–96.
197. **Langdon JS, Humphrey JD, Williams LM, Hyatt AD, Westbury HA** (1986): First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch, *Perca fluviatilis* L. *Journal of Fish Diseases* **9**, 263–268.
198. **LaPatra SE, Batts WN, Overturf K, Jones GR, Shewmaker WD, Winton JR** (2001a): Negligible risk associated with the movement of processed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), from an infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) endemic area. *Journal of Fish Disease* **24**, 399–408.
199. **LaPatra SE, Corbeil S, Jones GR, Shewmaker WD, Kurath G** (2000): The dose-dependent effect on protection and humoral response to a DNA

- vaccine against IHN virus in subyearling rainbow trout. *Journal of Aquatic Animal Health* **12**, 181–188.
200. **LaPatra SE, Corbeil S, Jones GR, Shewmaker WD, Lorenzen N, Anderson ED, Kurath G** (2001b): Protection of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus four days after specific or semi-specific DNA vaccination. *Vaccine* **19**, 4011–4019.
 201. **LaPatra SE, Groberg WJ, Rohovec JS, Fryer JL** (1990c): The delayed appearance of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in steelhead trout (*Salmo gairdneri*). In: Ahne, W. and Krustak, E. (eds) *Viruses of Lower Vertebrates*. Springer-Verlag, New York, pp. 430–441.
 202. **LaPatra SE, Groff JM, Patterson TL, Shewmaker WD, Casten M, Siple J, Hauck AK** (1996): Preliminary evidence of sturgeon density and other stressors on manifestation of white sturgeon iridovirus disease. *J. Appl. Aquacult.* **6**, 51–58.
 203. **LaPatra SE, Parsons JE, Jones GR, McRoberts WO** (1993c): Early life stage survival and susceptibility of brook trout, coho salmon, rainbow trout, and their reciprocal hybrids to infectious hematopoietic necrosis virus. *Journal of Aquatic Animal Health* **5**, 270–274.
 204. **LaPatra SE, Rohovec JS, Fryer JL** (1989b): Detection of infectious hematopoietic necrosis virus in fish mucus. *Fish Pathology* **24**, 197–202.
 205. **LaPatra SE, Turner T, Lauda KA, Jones GR, Walker S** (1993b): Characterization of the humoral immune response of rainbow trout to infectious hematopoietic necrosis virus. *Journal of Aquatic Animal Health* **5**, 165–171.
 206. **Lecocq-Xhonneux F, Thiry M, Dheur I, Rossius M, Vanderheijden N, Martial J, et al.** (1994): A recombinant viral haemorrhagic septicaemia virus glycoprotein expressed in insect cells induces protective immunity in rainbow trout. *J. Gen. Virol.* **75** (Pt 7), 1579–1587.
 207. **Lee J, Feldman AR, Delmas B, Paetzel M** (2007): Crystal structure of the VP4 protease from infectious pancreatic necrosis virus reveals the acyl-enzyme complex for an intermolecular self-cleavage reaction. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 24928–24937.

208. **Leimbach S, Schutze H, Bergmann SM** (2014): Susceptibility of European sheatfish *Silurus glanis* to a panel of ranaviruses. *Journal of Applied Ichthyology* **30**, 93–101.
209. **Leong J, Brown D, Dobos P, Kibenge F, Ludert J, et al.** (2000): Family *Birnaviridae*. In: Van Regenmortel, M., Bishop, D., Calisher, C., Carsten, E., Estes, M. et al. (eds) *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New York, pp. 481–490.
210. **Leong JC, Fryer JL** (1993): Viral vaccines for aquaculture. *Annu. Rev. Fish Diseases* **3**: 225–240.
211. **Lervik K, Bakke Jøssund TJ, Skjelstad B, Sundet T, Gaasø S** (2003): Distribution and significance of infectious pancreatic necrosis (IPN) among salmon in ongrowing seawater farms in Trøndelag, Northern Møre and Romsdal during 2002. Unpublished report, National Veterinary Institute Trondheim, 6 pp.
212. **Lientz JC, Springer JE** (1973): Neutralization tests of infectious pancreatic necrosis virus with polyvalent antiserum. *J. Wildlife Dis.* **9**,120–124.
213. **Lightner D, Post G** (1969): Morphological characteristics of infectious pancreatic necrosis virus in trout pancreatic tissue. *J. Fish. Res. Board Can.* **26**,2247–2250.
214. **Liltved H, Vogelsang C, Modahl I, Dannevig BH** (2006): High resistance of fish pathogenic viruses to UV irradiation and ozonated seawater. *Aquaculture Engineering* **34**, 72-82.
215. **Liu Z, Teng Y, Liu H, Jiang Y, Xie X, Li H, Lv J, Gaob L, Heb J, Shi X, Tian F, Yang J, Xie C** (2008): Simultaneous detection of three fish rhabdoviruses using multiplex real-time quantitative RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods* **149**, 103–109.
216. **Lockhart K, Gahlawat SK, Soto-Mosquera D, Bowden TW, Ellis AE** (2004): IPNV carrier salmon growers do not express Mx mRNA and poly I:C induced Mx response does not cure the carrier state. *Fish and Shellfish Immunology* **17**, 347-352.

217. **Lockhart K, McBeath AJA, Collet B, Snow M, Ellis AE** (2007): Expression of Mx mRNA following infection with IPNV is greater in IPN-susceptible Atlantic salmon post-smolts than in IPN-resistant Atlantic salmon parr. *Fish and Shellfish Immunology* **22**, 151-156.
218. **Lopez-Lastra M, Gonzalez M, Jashes M, Sandino AM** (1994): A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR). *J. Fish Dis.* **17**,269–282.
219. **Lorenzen E, Carstensen B, Olesen NJ** (1999): Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. *Diseases Of Aquatic Organisms*, **37**: 81-88.
220. **Lorenzen N, LaPatra SE** (1999): Immunity to rhabdoviruses in rainbow trout: the antibody response. *Fish Shellfish Immunol.* **9**, 345–360.
221. **Lorenzen N, LaPatra SE** (2005): DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev. Sci. Tech.* **24**, 201–213..
222. **Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, LaPatra SE** (2002a): Immunity induced shortly after DNA vaccination of rainbow trout against rhabdoviruses protects against heterologous virus but not against bacterial pathogens. *Developmental and Comparative Immunology* **26**, 173–179.
223. **Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, LaPatra SE** (2002b): DNA vaccines as a tool for analysing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout. *Fish and Shellfish Immunology* **12**, 439–453.
224. **Lorenzen N, Olesen NJ, Jorgensen PE, Etzerodt M, Holtet TL, Thogersen HC** (1993): Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the glycoprotein gene of VHS virus, and immunization of rainbow trout with the recombinant protein. *J. Gen. Virol.* **74** (Pt 4), 623–630.
225. **Lumsden JS, Morrison B, Yason C, Russell S, Young K, Yazdanpanah A, et al.** (2007): Mortality event in freshwater drum *Aplodinotus grunniens* from Lake Ontario, Canada, associated with viral haemorrhagic septicemia virus, type IV. *Dis. Aquat. Organ.* **76**, 99–111.
226. **MacKinnon AM, Cook T, Hawley LL, Traxler G, Morrison D, Salenius K** (2008): Efficacy of APEX IHN vaccine in Atlantic salmon subjected to an IHNV challenge simulating natural and/or elevated field challenges.

American Fisheries Society–Fish Health Section, Annual Meeting, 9–12 July 2008, p. 119 (abstract).

227. **Magyar G, Dobos P** (1994a): Expression of infectious pancreatic necrosis virus polyprotein and VP1 in insect cells and the detection of the polyprotein in purified virus. *Virology* **198**,437–445.
228. **Manning DS, Leong JC** (1990): Expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* **179**,16–25.
229. **Manning DS, Mason CL, Leong JC** (1990): Cell-free translational analysis of the processing of infectious pancreatic necrosis virus polyprotein. *Virology* **179**,9–15.
230. **Marsh IB, Whittington RJ, O'Rourke B, Hyatt AD, Chisholm O** (2002): Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. *Molecular and Cellular Probes* **16**, 137–151.
231. **Matejusova I, McKay P, McBeath AJ, Collet B, Snow M** (2008): Development of a sensitive and controlled real-time RT-PCR assay for viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in marine salmonid aquaculture. *Dis. Aquat. Organ.* **80**, 137–144.
232. **Mavian C, López-Bueno A, Fernández Somalo MP, Alcamí A, Alejo A** (2012): Complete genome sequence of the European sheatfish virus. *Journal of Virology* **86**, 6365–6366.
233. **McAllister PE** (1990): Fish Disease Leaflet 83: Viral Hemorrhagic Septisemia of Fishes. US Fish and Wildlife Service. National Fisheries Research Center–Leetown. National Fish Health Research Laboratory, Kersneysville, West Virginia.
234. **McAllister PE** (1993): Salmonid fish viruses. In *Fish Medicine*, (MK Stoskopf, ed.), pp. 380–408. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
235. **McAllister PE** (1997): Susceptibility of 12 linkages of chinook salmon embryo cells (CHSE-214) to four viruses from salmonid fish: implications for clinical assay sensitivity. *J.Aquat. Anim. Health.* **9**,291–294.
236. **McAllister PE, Wagner RR** (1975): Structural proteins of two salmonid rhabdoviruses. *Journal of Virology* **15**, 733–738.

237. **McBeath AJA, Snow M, Secombes CJ, Ellis AE, Collet B** (2007): Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus. *Fish and Shellfish Immunology* **22**, 230-241.
238. **McGonigle RH** (1940): Acute catarrhal enteritis of salmonid fingerlings. *Transactions of the American Fisheries Society* **70**, 297-302.
239. **McKnight IJ, Roberts RJ** (1976): The pathology of infectious pancreatic necrosis: The sequential histopathology of the naturally occurring condition. *Br. Vet.* **132**, 76-86.
240. **Melby HP, Christie KE** (1994): Antigenic analysis of reference strains and Norwegian field strains of aquatic birnaviruses by the use of six monoclonal antibodies produced against the infectious pancreatic necrosis virus N1 strain. *J. Fish Dis.* **17**, 409-415.
241. **Meyers TR, Short S, Lipson K** (1999): Isolation of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) associated with epizootic mortality in two new host species of Alaskan marine fish. *Dis. Aquat. Organ.* **38**, 81-86.
242. **Mikalsen AB, Torgersen J, Alestrom P, Hellemann AL, Koppang EO, Rimstad E** (2004): Protection of Atlantic salmon *Salmo salar* against infectious pancreatic necrosis after DNA vaccination. *Diseases of Aquatic Organisms* **60**, 11-20.
243. **Miller K, Traxler G, Kaukinen K, Li S, Richard J, Ginther N** (2007): Salmonid host response to infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus: cellular receptors, viral control, and novel pathways of defence. *Aquaculture* **272S1**, S217-S237.
244. **Miller TA, Rapp J, Wasthuber U, Hoffmann RW, Enzmann PJ** (1998): Rapid and sensitive reverse transcriptase polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells. *Diseases of Aquatic Organisms* **34**, 13-20.

245. **Montero J, Garcia J, Ordas MC, Casanova I, Gonzalez A, Villena A, et al.** (2011): Specific regulation of the chemokine response to viral hemorrhagic septicemia virus at the entry site. *J. Virol.* **85**, 4046–4056.
246. **Mortensen SH, Nilsen RK, Hjeltnes B** (1998): Stability of an infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolate stored under different laboratory conditions. *Dis. Aquat. Org.* **33**, 67–71.
247. **Morzunov SP, Winton JR, Nichol ST** (1995): The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. *Virus Research* **38**, 175–192.
248. **Mulcahy D, Jenes CK, Pascho R** (1984a): Appearance and quantification of infectious hematopoietic necrosis virus in female sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) during their spawning migration. *Archives of Virology* **80**, 171–181.
249. **Mulcahy D, Pascho R** (1984): Adsorption to fish sperm of vertically transmitted fish viruses. *Science* **225**, 333–335.
250. **Mulcahy D, Pascho RJ, Batts WN** (1987): Testing of male sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) and steelhead trout (*Salmo gairdneri*) for infectious hematopoietic necrosis virus. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **44**, 1075–1078.
251. **Mulcahy D, Pascho RJ, Jenes CK** (1983b): Titre distribution patterns of infectious haematopoietic necrosis virus in ovarian fluids of hatchery and feral salmon populations. *Journal of Fish Diseases* **6**, 183–188.
252. **Mulcahy D, Pascho RJ, Jenes CK** (1984b): Comparison of *in vitro* growth characteristics of ten isolates of infectious hematopoietic necrosis virus. *Journal of General Virology* **65**, 2199–2207.
253. **Mulcahy D, Wood J** (1986): A natural epizootic of infectious haematopoietic necrosis in imported Atlantic salmon, *Salmo salar* L., reared in the enzootic region. *Journal of Fish Diseases* **9**, 173–175.
254. **Mulcahy DM, Pascho RJ** (1986): Sequential tests for infectious hematopoietic necrosis virus in individuals and populations of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **43**, 2515–2519.

255. **Nicholson BL, Pochebit S** (1981): Antigenic analysis of infectious pancreatic necrosis viruses (IPNV) by neutralization kinetics. In “Proceedings of the International Symposium on Fish Biologies: Serodiagnostics and Vaccines” (D. P. Anderson and W. Hennensen, eds.), pp. 35–41. Karger, Basel.
256. **Nishizawa T, Savaş H, Işıdan 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.
257. **Niu L, Zhao Z** (1988): The epidemiological IHN and IPN of rainbow trout in northeast China. *Journal of Fisheries of China*, **12**, 351–352.
258. **Novoa B, Blake S, Nicholson BL, Figueras A** (1995b): Comparison of different procedures for serotyping aquatic birnavirus. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2925–2929.
259. **Ogut H, Altuntas C** (2012): Occurrence and prevalence of infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in cages in the Black Sea. *Aquac. Res.* **43**: 1550–1556.
260. **Ogut H, Altuntas C** (2014): Survey of viral haemorrhagic septicaemia virus in wild fishes in the southeastern Black Sea. *Diseases of Aquatic Organisms* **109** (2), 99-106
261. **Ogut H, Altuntas C, Parlak R** (2013): Viral Surveillance of Cultured Rainbow Trout in the Eastern Black Sea, Turkey. *Journal of Aquatic Animal Health* **25**:27–35, 2013
262. **OIE** (2001): “Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases,” 3rd Ed. OIE, Paris.
263. **OIE** (2003): Chapter 2.1.8. Infectious pancreatic necrosis. In: *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*, 4th edn., World Organisation for Animal Health, Paris, pp. 142–151. Available at: <http://www.oie.int/doc/ged/D6505.PDF> (accessed 17 November 2016).
264. **OIE** (2012): *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris (http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/a_00019.htm, accessed 6 July 2012).

265. **OIE** (2007): World Animal Health Information Database (WAHID) – Version 1.2. (<http://www.oie.int/wahidprod/public.php?page=home>, accessed 7 July 2008).
266. **OIE** (2009): Chapter 1.1.3. Methods for disinfection of aquaculture establishments. In: *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*, 6th edn. World Organisation for Animal Health, Paris, pp. 31–42.
267. **OIE** (2010): Chapter 1.4. Aquatic animal health surveillance. In: *Aquatic Animal Health Code, 2010*. World Organisation for Animal Health, Paris.
268. **OIE** (2016b): Chapter 2.3.1 Epizootic haematopoietic necrosis. In *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals* (World Organisation for Animal Health)
269. **OIE** (2010a): Manual and Diagnostic Tests for Aquatic Animals, Chapter 2.3.9. Viral Hemorrhagic Septicemia World Organisation for Animal Health.
270. **Okamoto N, Shirakura T, Nagakura Y, Sano T** (1993): The mechanism of interferon with fish viral infection in the RTG-2 cell line. *Fish Pathol.* **18**,7–12.
271. **Olesen N** (1998): Sanitation of viral haemorrhagic septicaemia (VHS). *J. Appl. Ichthyol.* **14**, 173-177.
272. **Olesen N, Lorenzen N, Jørgensen PE** (1991): Detection of rainbow trout antibody to Egtved virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence (IF), and plaque neutralization tests (50% PNT). *Dis. Aquat. Organ.* **10**, 31–38.
273. **Olesen NJ, Jørgensen P** (1986): Detection of neutralizing antibody to Egtved virus in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by plaque neutralization test with complement addition. *J. Appl. Ichthyol.* **2**, 33–41.
274. **Olesen NJ, Jørgensen PEV, Bloch B, Møllgaard S** (1988): Isolation of an IPN-like virus belonging to the serogroup II of the aquatic birnaviruses from dab (*Limanda limanda*). *J. Fish Dis.*, **11**, 449–451.
275. **Ooi EL, Verjan N, Haraguchi I, Oshima T, Kondo H, Hirono I, Aki T, Kiyono H, Yuki Y** (2008): Innate immunomodulation with recombinant interferon- α enhances resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to

- infectious hematopoietic necrosis virus. *Developmental and Comparative Immunology* **32**, 1211–1220.
- 276. Ortega CS, Montes de Oca R, Groman D, Yason C, Nicholson B, Blake S** (2002): Case report: viral infectious pancreatic necrosis in farmed rainbow trout in Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health* **14**, 305–310.
- 277. Overturf K, LaPatra S** (2006): Quantitative expression of immunological factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), after infection with either *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromonas salmonicida*, or infectious haematopoietic necrosis virus. *Journal of Fish Diseases* **29**, 215–224.
- 278. Overturf K, LaPatra S, Powell M** (2001): Real-time PCR for the detection and quantitative analysis of IHNV in salmonids. *Journal of Fish Disease* **24**, 325–333.
- 279. Oye AK, Rimstad E** (2001): Inactivation of infectious salmon anaemia virus, viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious pancreatic necrosis virus in water using UVC irradiation. *Dis. Aquat. Organ.* **48**, 1–5.
- 280. Ozaki A, Sakamoto T, Khoo S, Nakamura K, Coimbra MR, Akutsu T, Okamoto N** (2001): Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Genet. Genomics* **265**, 23–31.
- 281. Parisot TJ** (1962): An interim report on Sacramento River chinook disease: a virus-like disease of chinook salmon. *Progressive Fish Culturist* **24**, 51.
- 282. Park MA, Sohn SG, Lee SD, Chun SK, Park JW, Fryer JL, Hah YC** (1993): Infectious haematopoietic necrosis virus from salmonids in Korea. *Journal of Fish Diseases* **16**, 471–478.
- 283. Parry L, Dixon PF** (1997): Stability of nine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates in seawater. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **17**, 31–36.
- 284. Parsons JE, Busch RA, Thorgaard GH, Scheerer PD** (1986): Increased resistance of triploid rainbow trout x coho salmon hybrids to infectious hematopoietic necrosis virus. *Aquaculture* **57**, 337–343.

- 285. Petit S, Lejal N, Huet JC, Delmas B** (2000): Active residues and viral substrate cleavage sites of the protease of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Virology* **74**, 2057-2066.
- 286. Pettersen EF** (1997): Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and the development of a viral vaccine. *Norsk Veter.* **109**,499–506.
- 287. Pilcher KS, Fryer JL** (1980): The viral diseases of fish: a review through 1978. Part I: Diseases of proven viral etiology. *CRC Critical Reviews in Microbiology* **7**, 287–364.
- 288. Piper RG, Mc Elwain IB, Orme LE, McCraren JP, Fowler LG, Leonard JR** (1982): “Fish Hatchery Management.” U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, DC.
- 289. Pitchugina T, Borissova M, Dyankonov LP, Yurov KP, Tkachev IY, Nadtochey GA, Yakovlev SS** (2003): Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from young Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Russia. In: *Proceedings of the 2nd Bilateral Conference (US-Russia) on Aquatic and Marine Animal Health*, Sheperdstown, West Virginia, 21-28 September 2003, p. 16.
- 290. Purcell M, Lapatra S, Woodson J, Kuratah G, Winton J** (2012): Early viral replication and induced or constitutive immunity in rainbow trout families with differential resistance to infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Fish and Shellfish Immunology* **28**, 98–105.
- 291. Purcell MK, Kurath G, Garver KA, Herwig RP, Winton JR** (2004): Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination. *Fish and Shellfish Immunology* **17**, 447–462.
- 292. Purcell MK, Nichols KM, Winton JR, Kurath G, Thorgaard GH, Wheeler P, Hansen JD, Herwig RP, Park LK** (2006b): Comprehensive gene expression profiling following DNA vaccination of rainbow trout against infectious haematopoietic necrosis virus. *Molecular Immunology* **43**, 2089–2106.

- 293. Ramstad A, Midtlyng PJ** (2008): Strong genetic influence on IPN vaccination-and challenge trials in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **31**, 567-578.
- 294. Rasmussen CJ** (1965): A Biological Study of The Egtved Disease (INUL). *Annals of The New York Academy of Sciences*, **126**, 427-460.
- 295. Reddacliff LA, Whittington RJ** (1996): Pathology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and redfin perch (*Perca fluviatilis* L). *Journal of Comparative Pathology* **115**, 103-115.
- 296. Reno PW** (1999): Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In "Fish Diseases and Disorders," Vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections (P. T.Woo and D. W. Bruno, eds.), Vol. 3, pp. 1-55. CAB Publishing, Wallingford.
- 297. Rimstad E, Homes E, Olsvik O, Hyllseth B** (1990): Identification of a doublestranded RNA virus by using polymerase chain reaction and magnetic separation of the synthesized DNA segments. *J. Clin. Microbiol.* **28**,2275-2278.
- 298. Ristow SS, Arnzen-de Avila J** (1991): Monoclonal antibodies to the glycoprotein and nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) reveal differences among isolates of the virus by fluorescence, neutralization and electrophoresis. *Diseases of Aquatic Organisms* **11**, 105-115.
- 299. Roberts RJ, Pearson MD** (2005): Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **28**, 383-390.
- 300. Rodriguez S, Borrego JJ, Perez Prieto SI** (2001): Comparative evaluation of five serological methods and RT-PCR assay for the detection of aquabirnaviruses in fish. *J. Virol. Methods* **97**(1-2),23-31.
- 301. Romero Brey I, Batts WN, Bandin I, Winton JR, Dopazo CP** (2004): Molecular characterisation of birnaviruses isolated from wild marine fishes at the Flemish Cap (Newfoundland). *Diseases of Aquatic Organisms* **61**, 1-10.

- 302. Rønneseth A, Fausa Pettersen E, Wergeland HI** (2006): Neutrophils and B-cells in blood and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) challenged with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish and Shellfish Immunology* **20**, 610–620.
- 303. Ross AJ, Pelnar J, Rucker RR** (1960): A virus-like disease of chinook salmon. *Transactions of the American Fisheries Society* **89**, 160–163.
- 304. Rucker RR, Whipple WJ, Parvin JR, Evans CA** (1953): A contagious disease of sockeye salmon possibly of virus origin. *US Fish and Wildlife Service Fisheries Bulletin* **54**, 35–46.
- 305. Rudakova SL, Kurath G, Bochkova EV** (2007): Occurrence and genetic typing of infectious hematopoietic necrosis virus in Kamchatka, Russia. *Diseases of Aquatic Organisms* **75**, 1–11.
- 306. Sadasiv E** (1995): Immunological and pathological responses of salmonids to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annu. Rev. Fish Dis.* **5**, 209–223.
- 307. Saint-Jean SR, Perez-Prieto SI** (2007): Effects of salmonid fish viruses on Mx gene expression and resistance to single or dual viral infections. *Fish and Shellfish Immunology* **23**, 390–400.
- 308. Saksida SM** (2006): Infectious haematopoietic necrosis epidemic (2001 to 2003) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in British Columbia. *Diseases of Aquatic Organisms* **72**, 213–223.
- 309. Salenius K, Simard N, Harland R, Ulmer JB** (2007): The road to licensure of a DNA vaccine. *Current Opinion in Investigational Drugs* **8**, 635–641.
- 310. Sano T** (1971): Studies on viral diseases of Japanese fishes. I. Infectious pancreatic necrosis of rainbow trout: Pathogenicity of the isolates. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* **37**, 499–503.
- 311. Sano T** (1973): Studies on viral diseases of Japanese fishes. V. Infectious pancreatic necrosis of amago trout. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* **39**, 477–480.
- 312. Sano T, Nishimura T, Okamoto N, Yamazaki T, Hanada H, Watanabe Y** (1977): Studies on viral disease of Japanese fish – VI. Infectious hematopoietic necrosis (IHN) of salmonids in the mainland of Japan. *Journal of the Tokyo University of Fisheries* **63**, 81–85.

313. **Santi N, Sandtrø A, Sindre H, Song H, Hong JR, Thu B, Wu JL, Vakharia VN, Evensen Ø** (2005b): Infectious pancreatic necrosis virus induces apoptosis *in vitro* and *in vivo* independent of VP5 expression. *Virology* **342**, 13-25
314. **Santi N, Song H, Vakharia VN, Evensen Ø** (2005a): Infectious pancreatic necrosis virus VP5 is dispensable for virulence and persistence. *Journal of Virology* **79**, 9206-9216.
315. **Schäperclaus W** (1938): Die Schädigungen der Deutschen Fischerei Durch Fischparasiten und Fischkrankheiten. *Fischerei Zeitung*, **22**, 1–20.
316. **Schäperclaus W** (1954): Undersøgelse af Sygdom hos Ørredernei Danske ørreddambrug og Forslag til Bakæmpelse Heraf. *Ferskvandsfiskeribladet*, **52**, 145–149.
317. **Schlotfeldt HJ** (1979): Die infektiöse Pankreasnekrose (IPN) der Salmoniden, Teil I: Aetiologie, Epizootologie und Bekämpfung. *Tierärztliche Umschau* **34**, 539–546.
318. **Schütze H, Enzmann PJ, Kuchling R, Mundt E, Niemann H, Mettenleiter TC** (1995): Complete genomic sequence of the fish rhabdovirus infectious haematopoietic necrosis virus. *Journal of General Virology* **76**, 2519–2527.
319. **Schütze H, Mundt E, Mettenleiter TC** (1999): Complete Genomic Sequence of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus, a Fish Rhabdovirus. *Virus Genes* **19**, 59-65.
320. **Seo JJ, Heo GJ** (1998): Characterisation of aquatic birnavirus isolated from rockfish *Sebastes schlegeli* cultured in Korea. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **18**, 87-92.
321. **Silim A, Elazharyan MASY, Lagac DA** (1982): Susceptibility of trouts of different species and origins to various isolates of infectious pancreatic necrosis virus. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **39**: 1580 - 1584.
322. **Siwicki AK, Morand M, Klein P, Kicka W** (1998): Treatment of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) disease using dimerized lysozyme (KLP-602). *Journal of Applied Ichthyology* **14**, 229-232.

- 323. Siwicki AK, Pozet F, Morand M, Kazun B, Trapkowska S** (2002): *In vitro* effect of methisoprinol on salmonid rhabdoviruses replication. *Bulletin Veterinary Institute Pulawy* **46**, 53–58.
- 324. 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.
- 325. Skall HF, Møllergaard S, Olesen NJ** (2000): Isolation of Birnavirus serogroup B in wild and aquacultured fish species. *Bulletin of the Association of Fish Pathologists* **20**, 229-236.
- 326. Skall HF, Olesen NJ, Møllergaard S** (2005): Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming – a review. *J. Fish Diseases*, **28**, 509–529.
- 327. Smail DA** (1995): Isolation and Identification of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS)Virus from North Sea Cod (*Gadus morhua* L.) ICES CM 1995/F:15.
- 328. Smail DA** (2000): Isolation and Identification of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS)Viruses from Cod (*Gadus morhua*) with The Ulcer Syndrome and from Haddock(*Melanogrammus aeglefinus*) Having Skin Hemorrhages in The North Sea. *Diseases of Aquatic Organisms*, **41**, 231–235.
- 329. 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. *Journal of Fish Diseases* **29**, 31–41.
- 330. Smail DA, Bruno DW, Dear G, McFarlane LA, Ross K** (1992): Infectious pancreatic necrosis IPN virus Sp serotype in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post smolts associated with mortality and clinical diseases. *J. Fish Dis.* **15**,77–83.

- 331. Smail DA, McFarlane LA, Bruno DW, McVicar AH** (1995): The pathology of an IPN-Sp sub-type (Sh) in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts in the Shetland Isles, Scotland. *J. Fish Dis.* **18**,631–638.
- 332. Smail DA, Snow M** (2011): Viral hemorrhagic septicemia. In: Woo, P.T.K., Bruno, D.W. (Eds.), *Fish Diseases and Disorders*, vol. 3. CAB International, Wallingford, pp. 123–146.
- 333. Snieszko SF, Wood EM, Yasutake T** (1957): Infectious pancreatic necrosis in trout. *Am. Med. Assoc. Arch. Pathol.* **63**,229–233.
- 334. Snow M, Cunningham CO** (2000): Virulence and nucleotide sequence analysis of marine viral haemorrhagic septicaemia virus following in vivo passage in rainbow trout *Onchorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Organ.* **42**, 17–26.
- 335. Snow M, Cunningham CO, Melvin WT, Kurath G** (1999): Analyses of TheNucleoprotein Gene Identifies Dinstinct Lineages of Viral Hemorrhagic SepticemiaVirus within The European Marine Environment. *Virus Research*, **63**, 35–44.
- 336. Sohn SG, Parck MA, Do JW, Choi JY, Parck JW** (1995): Birnavirus isolated from culture flounder in Korea. *Fish Pathol.* **30**,279–280.
- 337. Soliman H, Middlyng PJ, El-Matbouli M** (2009): Sensitive and rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus by reverse transcription loop mediated isothermal amplifi cation. *Journal of Virological Methods* **158**, 77–83.
- 338. Spinkler AR** (2007): Infectious hematopoietic necrosis. CFSPH Technical Disease Fact_Sheets.4p.(http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/infectious_hematopoietic_necrosis.pdf, accessed 1 October 2008).
- 339. St-Hilaire S, Ribble CS, Stephen C, Anderson E, Kurath G, Kent ML** (2002): Epidemiological investigation of infectious hematopoietic necrosis virus in salt water net-pen reared Atlantic salmon in British Columbia Canada. *Aquaculture* **212**, 49–67.
- 340. Stohlman SA, Woodward JG, Frelinger JA** (1982): Macrophage antiviral activity: extrinsic versus intrinsic activity. *Infect. Immun.* **36**, 672–677.

- 341. Stone DM, Ferguson HW, Tyson PA, Savage J, Wood G, Dodge MJ, et al.** (2008): The first report of viral haemorrhagic septicaemia in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in the United Kingdom. *J. Fish Dis.* **31**, 775–784.
- 342. Swanson RN, Gillespie JH** (1979): Pathogenesis of infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Fish. Res. Board Can.* **36**, 587–591.
- 343. Tafalla C, Chico V, Perez L, Coll JM, Estepa A** (2007): In vitro and in vivo differential expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx isoforms in response to viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) G gene, poly I:C and VHSV. *Fish Shellfish Immunol.* **23**, 210–221.
- 344. 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.
- 345. Tafalla C, Novoa B** (2001): Respiratory burst of turbot (*Scophthalmus maximus*) macrophages in response to experimental infection with viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Fish and Shellfish Immunol.* **11**, 727–734.
- 346. Tafalla C, Sanchez E, Lorenzen N, DeWitte-Orr SJ, Bols NC** (2008): Effects of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocyte cell line RTS-11. *Mol. Immunol.* **45**, 1439–1448.
- 347. Taksdal T, Dannevig BH, Rimstad E** (2001): Detection of infectious pancreatic necrosis (IPN)-virus in experimentally infected Atlantic salmon parr by RT-PCR and cell culture isolation. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **21**, 214-219.
- 348. Taksdal T, Stangeland K, Dannevig BH** (1997): Induction of infectious pancreatic necrosis (IPN) in Atlantic salmon *Salmo salar* and brook trout *Salvelinus fontinalis* by bath challenge of fry with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) serotype Sp. *Dis. Aquat. Org.* **28**, 39–44.

- 349. Tate H, Kodama H, Izawa H** (1990): Immunosuppressive effect of infectious pancreatic necrosis virus on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Japn. J. Vet. Sci.* **52**,931–937.
- 350. Timur G, Timur M, Kubilay A, Sarmaşık A** (1993): Electron microscopic and histopathologic investigations of Infectious Pancreatic Necrosis of some trout farms. (Aquatic Products Symposium 23 – 25 June 1993.) Unpublished symposium notes.
- 351. Tisdall DJ, Phipps JC** (1987): Isolation and characterisation of a marine birnavirus from returning Quinnet salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in the south island of New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* **35**, 217–218.
- 352. Toranzo AE, Barja JL, Lemos ML, Hetrick FM** (1983): Stability of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in untreated, filtered and autoclaved estuarine water. *Bull. of The Eur. Assoc. Fish Patholo.* **3**,51–53.
- 353. Toranzo AE, Hetrick FM** (1982): Comparative stability of two salmonid viruses and poliovirus in fresh, estuarine and marine waters. *J. Fish Dis.* **5**,223–231.
- 354. Traxler GS** (1986): An epizootic of infectious hematopoietic necrosis in 2-year-old kokanee, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) at Lake Cowichan, British Columbia. *Journal of Fish Diseases* **9**, 545–549.
- 355. Traxler GS, Anderson EA, LaPatra SE, Richard J, Shewmaker B, Kurath G** (1999): Naked DNA vaccination of Atlantic salmon *Salmo salar* against IHNV. *Diseases of Aquatic Organisms* **38**, 183–190.
- 356. Traxler GS, Roome JR, Kent ML** (1993): Transmission of infectious hematopoietic necrosis virus in salt water. *Diseases of Aquatic Organisms* **16**, 111–114.
- 357. Traxler GS, Roome JR, Lauda KA, LaPatra S** (1997): Appearance of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and neutralizing antibodies in sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* during their migration and maturation period. *Diseases of Aquatic Organisms* **28**, 31–38.
- 358. Underwood BO, Smale CJ, Brown F, Hill BJ** (1977): Relationship of a virus from *Tellina tenuis* to infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* **36**, 93-109.

- 359. Vardic I, Kapetanovic D, Teskeredlic Z, Teskeredlic E** (2007): First record of infectious haematopoietic necrosis virus in rainbow trout fry in Croatia. *Acta Veterinaria Brno* **76**, 65–70.
- 360. Varvarigos P, Way K** (2002): First isolation and identification of the infectious pancreatic necrosis (IPN) virus from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fingerlings farmed in Greece. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **22**, 195–200.
- 361. Verjan N, Ooi EL, Nochi T, Kondo H, Hirono I, Aoki T, Kiyono H, Yuki Y** (2008): A soluble nonglycosylated recombinant infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) G-protein induces IFNs in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology* **25**, 170–180.
- 362. Vestergård Jørgensen RE** (1982): Egtved virus: temperature-dependent immune response of trout to infection with low-virulence virus. *J. Fish Dis.* **5**, 47–55.
- 363. Vestergard-Jørgensen PE, Bregnballe F** (1969): Infectious pancreatic necrosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Denmark. *Nordisk Veterinærmedicin* **21**, 142–148.
- 364. Walker PJ, Benmansour A, Dietzgen R, Fang RX, Jackson AO, Kurath G, Leong JC, Nadin-Davis SA, Tesh RB, Tordo N** (2000): Family *Rhabdoviridae*. In: *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. et al., eds. Academic Press, San Diego, USA and London, UK, 563–583.
- 365. Wang WS, Lee JS, Shieh MT, Wi YL, Huang CJ, Chien MS** (1996): Detection of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from an outbreak in Taiwan by serological and polymerase chain reaction assays. *Diseases of Aquatic Organisms* **26**, 237–239.
- 366. Wang WS, Wi YL, Lee JS** (1997): Single-tube, non-interrupter reverse transcription PCR for detection of infectious pancreatic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.* **28**, 229–233.

- 367. Wetten M, Aasmundstad T, Kjølglum S, Storset A** (2007): Genetic analysis of resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* **272**, 111–117.
- 368. Whittington RJ, Becker JA, Dennis MM** (2010): Iridovirus infections in finfish – critical review with emphasis on ranaviruses. *Journal of Fish Diseases* **33**, 95–122.
- 369. Whittington RJ, Kearns C, Hyatt AD, Hengstberger S, Rutzou T** (1996): Spread of *Epizootic haematopoietic necrosis virus* (EHNV) in redfin perch (*Perca fluviatilis*) in southern Australia. *Australian Veterinary Journal* **73**, 112–114.
- 370. Whittington RJ, Philbey A, Reddacliff GL, Macgown AR** (1994): Epidemiology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): findings based on virus isolation, antigen capture ELISA and serology. *Journal of Fish Diseases* **17**, 205–218.
- 371. Whittington RJ, Reddacliff GL** (1995): Influence of environmental temperature on experimental infection of redfin perch (*Percus fluviatilis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with *Epizootic hematopoietic necrosis virus*, an Australian iridovirus. *Australian Veterinary Journal* **72**, 421–424.
- 372. Whittington RJ, Reddacliff LA, Marsh I, Kearns C, Zupanovic Z, Callinan RB** (1999): Further observations on the epidemiology and spread of *Epizootic haematopoietic necrosis virus* (EHNV) in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in southeastern Australia and a recommended sampling strategy for surveillance. *Diseases of Aquatic Organisms* **35**, 125–130.
- 373. Whittington RJ, Steiner KA** (1993): *Epizootic haematopoietic necrosis virus* (EHNV): improved ELISA for detection in fish tissues and cell cultures and an efficient method for release of antigen from tissues. *Journal of Virological Methods* **43**, 205–220.
- 374. Williams K, Blake S, Sweeney A, Singer JT, Nicholson BL** (1999): Multiplex Reverse Transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. *J. Clin. Microbiol.* **37(12)**, 4139–4141.

- 375. Williams T, Barbosa-Solomieu V, Chinchar VG** (2005): A decade of advances in iridovirus research. In: Maramorosch, K. and Shatkin, A.J. (eds) *Advances in Virus Research*. Elsevier/Academic Press, San Diego, California, pp. 173–248.
- 376. Winton JR** (1991): Recent advances in detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus in aquaculture. *Annu. Rev. Fish Dis.* **1**, 83–93.
- 377. Wolf K** (1988): Infectious hematopoietic necrosis. In: Wolf, K. (ed.) *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, New York, pp. 83–114.
- 378. Wolf K** (1988): Infectious pancreatic necrosis. In: Wolf, K. (ed.) *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, New York, pp. 115–157.
- 379. Wolf K** (1988): Viral Hemorrhagic Septicemia. In: Wolf, K. (ed.) *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, New York, pp. 217–249.
- 380. Wolf K, Quimby MC, Bradford AD** (1963): Egg-associated transmission of IPNV of trouts. *Virology* **21**,317–321.
- 381. Wolf K, Snieszko SF, Dunbar CE, Pyle E** (1960b): Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **104**,105–108.
- 382. Wood EM, Snieszko SF, Yasutake WT** (1955): Infectious pancreatic necrosis in brook trout. *Am. Med. Assoc. Arch. Pathol.* **60**,26–28.
- 383. Yamamoto T** (1974): Infectious pancreatic necrosis (IPN) virus carriers and antibody production in a population of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Microbiol.* **21**,1343–1347.
- 384. Yamamoto T, Batts WN, Arakawa CK, Winton JR** (1990): Multiplication of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout following immersion infection: whole-body assay and immunohistochemistry. *Journal of Aquatic Animal Health* **2**, 271–280.
- 385. Yamamoto T, Batts WN, Winton JR** (1992): *In vitro* infection of salmonid epidermal tissues by infectious hematopoietic necrosis virus and viral hemorrhagic septicemia virus. *Journal of Aquatic Animal Health* **4**, 231–239.

386. **Yamamoto T, Clermont TJ** (1990): Multiplication of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout following immersion infection: organ assay and electron microscopy. *Journal of Aquatic Animal Health* **2**, 261–270.
387. **Yamazaki T, Motonishi A** (1992): Control of infectious hematopoietic necrosis and infectious pancreatic necrosis in salmonid fish in Japan. In: Kimura, T. (ed.) *Proceedings of the Oji International Symposium on Salmonid Diseases*. Hokkaido University Press, Sapporo, Japan, pp. 103–110.
388. **Yasutake WT** (1970): Comparative histopathology of epizootic salmonid virus diseases. In: Snieszko, S.F. (ed.) *A Symposium on Diseases of Fish and Shellfish*. American Fisheries Society Special Publication 5, Washington, DC, pp. 341–350.
389. **Yasutake WT** (1975): Fish virus diseases: clinical, histopathological, and comparative aspects. In: Ribelin, W.E. and Migaki, G. (eds) *The Pathology of Fishes*. University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, pp. 247–269.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Hüseyin ALP
Doğum Yeri ve Yılı : Korkuteli - 1987
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce (YDS: 61,25)
Uyruğu : Türk
Telefon No : 05426805470
Elektronik Posta : huseyin.alp@tarim.gov.tr
İletişim Adresi : Bağlar Mah. 14034 Sokak
Kaymakçı Sitesi D Blok Burdur



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lisans: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2005-2010
The University of Trás-os-Montes and Alto Douro 2009-2010

Yüksek Lisans: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2013-

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl (Mesleki Deneyim):

1. Antalya Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği, 2010-2011
2. Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü, 2011-2017
3. Burdur ili Tefenni İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, 2017-...

Yayımları (SCI ve diğer makaleler):

1. Türe, M. & Alp, H. (2016). Identification of bacterial pathogens and determination of their antibacterial resistance profiles in some cultured fish in Turkey. *Journal of Veterinary Research*, **60(2)**, pp. 141-146. Retrieved 16 Jan. 2018, from doi:10.1515/jvetres-2016-0020
2. Türe, M., Alp, H., Altuntaş, C., Kutlu, İ., Erbay, M., Savaş, H. (2017). Occurrence of Vancomycine Resistance Genes in Enterococci Isolated from Cage Areas in Turkey. *Genaqua Genetics Of Aquatic Organisms*, **1**: 9-13. doi: 10.4194/2459-1831-v1_1_02.

Üyesi Olduğu Mesleki Kuruluşlar:

- 1.