



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

**VİRAL HEMORAJİK SEPTİSEMİ VİRUSUNUN (VHSV)
FENOTİPİK KARAKTERİNİN VİRULANS ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yasemin ÇİÇEK

**Samsun
Ocak-2018**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

**VİRAL HEMORAJİK SEPTİSEMİ VİRUSUNUN (VHSV)
FENOTİPİK KARAKTERİNİN VİRULANS ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yasemin ÇİÇEK

DANIŞMAN
Prof. Dr. Harun ALBAYRAK

Samsun
Ocak-2018

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yasemin ÇİÇEK tarafından Prof. Dr. Harun ALBAYRAK Danışmanlığında hazırlanan **“Viral Hemorajik Septisemi Virüsünün (VHSV) Fenotipik Karakterinin Virulans Üzerine Etkisinin Araştırılması”** bu çalışma jürimiz tarafından 09/01/2018 tarihinde yapılan sınav ile Veterinerlik Viroloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Harun ALBAYRAK, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Yard. Doç. Dr. Hakan İŞİDAN, Cumhuriyet Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.../01 /2018

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŐEKKÜR

Bilgi ve desteğiyle yüksek lisans eğitiminin tamamlanmasını sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Harun ALBAYRAK'a, Anadilim Dalı Baőkanı Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA'ya, değerli hocam Prof. Dr. Zafer YAZICI'ya, laboratuvar çalışmalarında emeği geçen Cüneyt TAMER, Hasan Sercan PALANCI, Őermin ÖNKOL ve Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Viroloji bölümünün değerli alıőanları Abdullah AVUNT, Emre ÖZAN, Hamza KADI'ya teőekkür ederim. Emeęin, birlikte çalıőarak baőarıya dönüşmesini sağlayan tüm çalışma arkadaşlarıma ve aileme sevgilerimi sunarım.

Bu alıőma, PYO.VET.1904.17.009 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Baőkanlıęı tarafından desteklenmiőtir.

ÖZET

VİRAL HEMORAJİK SEPTİSEMİ VİRUSUNUN (VHSV) FENOTİPİK KARAKTERİNİN VİRULANS ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Viral Hemorajik Septisemi Virusu (*Piscine novirhabdovirus*), deniz ve tatlı su balıklarında enfeksiyonlara neden olan virustur. Bu çalışmada; Türkiye’de tatlı suda (Gökkuşluğu alabalığı) ve denizde (Kalkan balığı) yaşayan balıklardan izole edilen Bolu/06 ile TR-WS13G adlı iki VHSV izolatının farklı fenotiplerinin gökkuşluğu alabalıklarındaki (*Oncorhynchus mykiss*) klinik bulgular, mortalite oranı ve patojenitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada; Bolu/06 ve TR-WS13G VHSV izolatları plak saflaştırma yöntemiyle saflaştırıldı. Test sonunda her iki izolata ait dar ve geniş plak oluşturan 4 farklı saflaştırılmış izolat 60-100 g ağırlığındaki gökkuşluğu alabalıklarına intraperitoneal olarak verilerek deneysel enfeksiyon oluşturuldu. Deneysel enfeksiyon sırasında ölen veya deneme sonucunda öldürülen balıklarda realtime PCR metodu ile VHSV viral nükleik asit varlığı ve miktarı araştırıldı.

Bulgular: Deneysel enfeksiyon sonucunda mortalite oranı; kontrol grubunda %3,33, Bolu/06 dar plak izolat grubunda % 43,3, Bolu/06 geniş plak izolat grubunda %20, TR-WS13G dar plak izolat grubunda %33,3, TR-WS13G geniş plak izolat grubunda %14,8 olarak tespit edildi. rRT PCR testi sonucunda ölen\öldürülen balık örneklerinde $7,33 \times 10^4$ - $1,67 \times 10^2$ /µl arasında viral kopya sayısı tespit edildi. Balık organ örneklerinde en yoğun C_T değeri 28,35 olarak kaydedildi. Hastalığın açık klinik belirtileri enfekte edilme sonucu ölen balıkların tamamında gözlemlendi.

Sonuç: Fenotipik karakter olarak geniş ve dar plak oluşturan hem tatlı su izolatu Bolu/06 hem de deniz izolatu TR-WS13G’nin dar plak çapına sahip izolatlarının geniş plak oluşturan izolatlarından daha yüksek mortaliteye neden olduğu, gökkuşluğu alabalıklarından izole edilen tatlı su izolatu Bolu/06’nın kalkan balığından izole edilen deniz izolatu TR-WS13G’den daha patojen olduğu ortaya konulmuştur. Bu sonuçla; fenotipik karakterin virulans üzerinde önemli düzeyde etkili olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Plak Test; rRT PCR; Viral Hemorajik Septisemi Virusu; Gökkuşluğu alabalığı

Yasemin ÇİÇEK Yüksek Lisans Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Ocak-2018

ABSTRACT

RESEARCH OF THE VIRAL HEMORRHAGIC SEPTISEMIA VIRUS (VHSV) PHENOTYPIC CHARACTERISTICS EFFECT ON VIRULENCE

Aim: Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (*Piscine novirhabdovirus*) is a virus that causes infection in various marine and freshwater fish. It was aimed to determine the effect of different phenotypes of two VHSV isolates, Bolu\06 and TR-WS13G, isolated from fish living in freshwater (rainbow trout) and sea (turbot) in Turkey, on clinical findings, mortality rate and pathogenicity in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Material and Method: In this study, Bolu/06 and TR-WS13G VHSV isolates were purified by plaque purification method. At the end of the test, 4 different purified isolates, which form wide-narrow plaques of both isolates, were given intraperitoneally to rainbow trout weighing 60-100 g and experimental infection was performed. VHSV viral nucleic acid presence and quantity were investigated by realtime PCR method in dead or killed fish during experimental infection.

Results: Mortality rate due to experimental infection were detected as; %3.33 for control group; %43.3 for Bolu/06 narrow isolates group, %20 for Bolu/06 wide isolates group, %33.3 for TR-SW-13 narrow isolates group; and %14.8 for TR-SW-13 wide isolates group. The number of viral copies in the fish samples (dead/killed) were found to be 7.33×10^4 - 1.67×10^2 /µl by rRT-PCR. The most intensive CT value in the fish organ samples was recorded as 28.35. The clinical symptoms of the disease were observed in all of the fish that died as a result of infection.

Conclusion: The phenotypic character of the wide narrow- plaque forming isolates freshwater isolation Bolu / 06 and marine isolation TR-WS13G, have a higher mortality rate than wide plaque-forming isolates of narrow-plate isolates. Freshwater isolation from rainbow trout isolation Bolu/06 more pathogenic than turbot isolated from marine isolate TR-WS13G. This result showed phenotypic character has been shown to be significantly effective on virulence.

Keywords: Plaque Test; rRT PCR; Viral Hemorrhagic Septicemia Virus; Rainbow Trout

Yasemin ÇİÇEK, Master Thesis
Ondokuz Mayıs University-Samsun, January-2018

SİMGELER VE KISALTMALAR

BF-2	:Bluegill fry
CHSE-214	:Chinooksomon embriyo
CPE	:Sitopatik efekt
DKID₅₀	:Doku kültürü infektif doz
DMEM	:Dulbeccoos modified eagle's medium
ELISA	:Enzyme-linked immunosorbent assay
EPC	:Epithelioma papulosum cyprini
FDS	:Fötal dana serumu
FHM	:Fathead minnow
IFN	:Tip I interferon
OIE	:Dünya hayvan sağlığı örgütü
PNT	:Plak nötralizasyon testi
PCR	:Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	:Ribonükleik asit
rRT-PCR	:Real-time revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
RTG-2	:Rainbowtrout gonad
RT-PCR	:Revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
TÜİK	:Türkiye istatistik kurumu
VHSV	:Viral hemorajik septisemi virusu
ICTV	:Uluslararası virus taksonomisi komitesi

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Viral Hemorajik Septisemi Hastalığı	2
2.1.1. Tanım.....	2
2.1.2. Tarihçe	2
2.1.3. Etiyoloji	3
2.1.4. Epidemiyoloji	7
2.1.5. Patogenez.....	10
2.1.6. Klinik Bulgular	12
2.1.7. Teşhis.....	12
2.1.8. Bağışıklık.....	14
2.1.9. Koruma ve Kontrol.....	16
2.2. Amaç	17
3. MATERYAL VE METOT	18
3.1. Materyal	18
3.1.1. Hücre ve Virus	18
3.1.2. RNA Ekstraksiyonu, PCR Kitleri, Primerler ve Prob	19
3.1.3. Balık Örnekleri	19
3.1.4. Deneme Ünitesi Su Değerleri	20
3.2. Metot.....	22
3.2.1. Virus İzolatlarının Üretilmesi	22
3.2.2. Virus Mikrotitrasyon Testi	22
3.2.3. Plak Test	23
3.2.4. Balıklara Virus İnokülasyonu	23
3.2.5. Balık Örneklerinin Homojenizasyonu	24
3.2.6. RNA Ekstraksiyonu	25
3.2.7. rRT-PCR.....	26

4. BULGULAR	27
4.1. Plak Testi Çalışma Sonuçları	27
4.2. Patojenite Testi Çalışma Sonuçları	27
4.3. Moleküler Çalışma Sonuçları.....	29
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	34
KAYNAKLAR	35
EKLER	40
ÖZGEÇMİŞ	41



1.GİRİŞ

Viral hemorajik septisemi virusu (VHSV; *Piscine novirhabdovirus*) (ICTV, 2016) *Rhabdoviridae* ailesi *Novirhabdoviridae* cinsine aittir. Viral hemorajik septisemi hastalığı birçok deniz ve tatlı su balık türlerinde görülen sistemik bir enfeksiyondur. Özellikle yavru balıklar enfeksiyona duyarlıdır. Hastalık Avrupa'da ilk kez 1938'de ortaya çıkmış, tanımlanması ise 1963 yılında yapılmıştır (Skall ve ark., 2005). Virusun konağa girişi genellikle balığın yüzgeç bölgesidir. Bulaşma çoğunlukla kronik olarak enfekte balıkların virusu vücut sıvılarıyla yayması ile olmaktadır. Akut enfeksiyon semptomları uyusukluk, sarmal yüzme biçimi, koyulaşmış vücut rengi, soluk solungaçlar, ekzoftalmi ve yüzgeç kanamaları ile karakterizedir. Virus, genellikle kasları ve iç organlarda endotelial kan damarlarını hedef alır. Bu bölgelerde peteşiyal ya da ekimatöz hemorajiler oluşturur (Skall ve ark., 2005; Pham ve ark., 2013; OIE, 2017).

Teşhis yöntemi olarak genellikle serolojik testlerden ve moleküler yöntemlerden yararlanır. Serolojik testlerin bir çok avantajı vardır. Özellikle su sıcaklığının yüksek olduğu, endemik enfekte popülasyonlarda klinik semptom gözlenmediği ve hücre kültüründe izolasyon yapılamadığı durumlarda oldukça avantajlıdır. Serolojik testlerin dezavantajı ise özellikle düşük su sıcaklığında, enfeksiyondan sonra balıklarda antikor yanıtın yavaş gelişmesi sonucu spesifik antikorların tespitinin güç olmasıdır (Schyth ve ark.,2012).

Virusun dört genotipi vardır. Bu çeşitlilik coğrafik dağılım ile paralelik göstermektedir. Dört genotipten üçü, tatlısu ortamlarında gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) enfeksiyona neden olan virusun kaynağı olarak düşünülen, deniz balıklarında görülür (Bowen, 2011). Plak nötralizasyon testi sonuçlarına göre de 3 serotipi mevcuttur; tip 1 F1 zinciri (izolasyonu Danimarka'da yapılmıştır), tip 2 Heddam (izolasyonu Danimarka gökkuşağı alabalıklarında yapılmıştır) ve tip 3 (Fransa kahverengi alabalıklarından izole edilmiştir) (Gadd, 2013).

Bu çalışmada; Türkiye'de tatlı suda (gökkuşağı alabalığı) ve denizde (kalkan balığı) yaşayan balıklardan izole edilen Bolu/06 ile TR-WS13G adlı iki VHSV izolatının farklı fenotiplerinin gökkuşağı alabalıklarındaki (*Oncorhynchus mykiss*) klinik bulgular, mortalite oranı ve patojenitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Viral Hemorajik Septisemi Hastalığı

2.1.1. Tanım

Viral hemorajik septisemi, viral hemorajik septisemi virusunun (VHSV) neden olduğu, çeşitli deniz ve tatlı su balıklarında görülen sistemik bir enfeksiyondur. Enfeksiyon, her yaştaki balıklarda ortaya çıkabilir. Özellikle yavru ve genç balıklarda önemli mortaliteye neden olur; hayatta kalan balıklar ise asemptomatik, idrar, semen ve yumurta yüzeyi ile virus bulaştıran taşıyıcı olurlar (Skall ve ark.,2005; Bowen, 2011; Purcell ve ark., 2012).

Akut, kronik ve subklinik enfeksiyon türleri vardır. Gökkuşluğu alabalığındaki (*Oncorhynchus mykiss*) akut enfeksiyonlar, ilk semptomlar 30 gün içinde ortaya çıkar ve uyuşukluk, sarmal yüzme biçimi, koyulaşmış vücut rengi, soluk solungaçlar, ekzoftalmi ve yüzgeç kanamaları ile karakterizedir. Mortalite genellikle genç balıklarda % 100'e ulaşabilir. Subklinik ve kronik olarak enfekte olan balıklarda gözle görülür belirti olmasa da, beyinde tropizm, anormal yüzme davranışıyla ortaya çıkan sinir şekliyle de sonuçlanabilir (Bowen, 2011; Kim ve Faisal, 2011; Gadd, 2013; OIE, 2017).

2.1.1. Tarihçe

Hastalığı ilk kez 1938'de Schaperclaus, Danimarka gökkuşluğu alabalık çiftliklerinde "Bulaşıcı Böbrek Şişmesi ve Karaciğer Dejenerasyonu" olarak tanımlamıştır. Schaperclaus, hastalığın bakteri içermeyen doku homojenat filtratları kullanılarak balıklara yayıldığını tespit ettiği için viral bir etken olabileceğini düşünmüştür. 1963 yılında, ilk raporun yayınlanmasından yaklaşık otuz yıl sonra, viral etiyolog Jensen tarafından virus, gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) gonad hücre dizisi RTG-2 (Rainbow Trout Gonad) hücre hattından izole edip "Egtved" virusu olarak tanımlamıştır (Skall ve ark., 2005). Bu terminoloji, 2000 yılında Uluslararası Virus Taksonomisi Komitesi tarafından virusun adının VHSV (Viral hemorajik septisemi virusu) olarak değiştirmesine kadar kullanılmıştır. Virus, 2016 yılında aynı komite tarafından *Piscine novirhabdovirus* olarak tekrar tanımlanmıştır (ICTV, 2016).

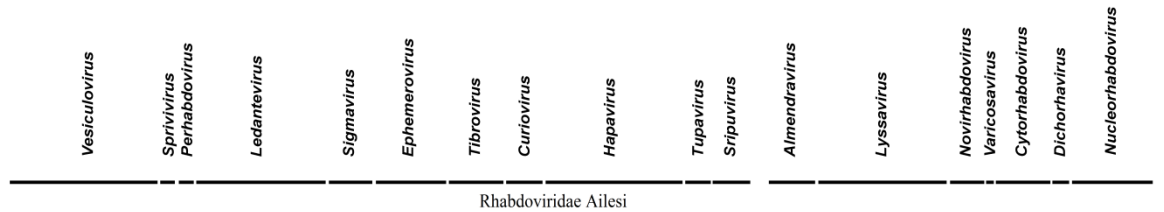
Virus daha sonra Fransa, İtalya ve Polonya gibi diğer Avrupa ülkelerinde de izole edilmiştir. 1970'li yıllarda yaygınlaşan bu hastalığa karşı araştırmacılar, virusun

biyolojik ve biyofiziksel özelliklerini tanımlamak ve açıklamak için çeşitli çalışmalar yapmıştır. Yapılan serolojik araştırmalar sonucunda, iki farklı VHSV suşunun varlığı kanıtlanmış; ancak daha sonra kahverengi alabalıklardan (*Salmo trutta L.*) üçüncü bir suşun varlığını ortaya koyulmuştur (Kinkelin ve Berre, 1977).

Virusun, yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıklarında kitlesel ölümlerden sorumlu olduğunun keşfedilmesi sonrasında virusun karakterize edilmesi ve duyarlı teşhis metotlarının geliştirilmesine yol açmıştır (Kim ve Faisal, 2011).

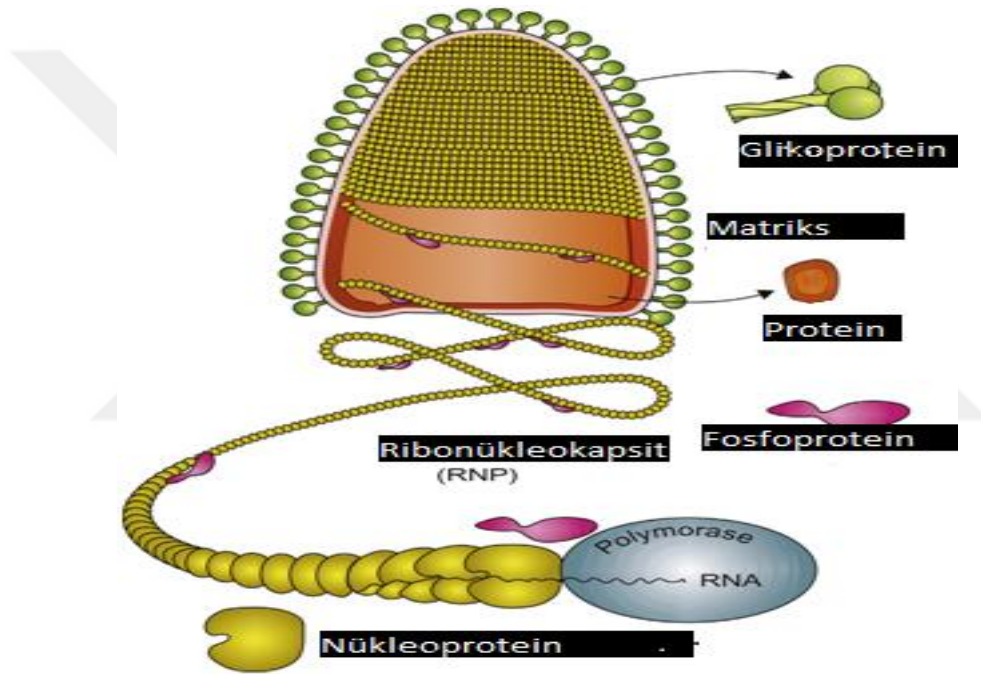
2.1.3. Etiyoloji

Rhabdoviridae ailesi, memeliler, kuşlar, balıklar, böcekler ve bitki de dahil birçok konakçıya bulaşan onsekiz cins virüsü kapsar. *Rhabdoviridae* ailesi, kuduz, veziküler stomatit, sığır ephemeral fever virüsü ve bazı önemli balık rhabdoviruslarını da kapsayan birçok önemli hayvan ve insan patojenlerini içerir. Son zamanlarda, Kongo Demokratik Cumhuriyeti'nde yeni bir rhabdovirus olan Bas-Congo virüsü (BASV) tespit edilmiş olup, insanlardaki akut hemorajik ateşle potansiyel olarak yakınlık göstermesi açısından *Rhabdoviridae* ailesinin ilk örneği olmuştur. BASV'nin tanımlanması ile rhabdovirusların klinik ve halk sağlığı üzerinde önemi artmış ve bu aileye ait virüslerin karakterizasyonu hız kazanmıştır (McAllister ve ark., 2014). *Rhabdoviridae* ailesinde hayvansal virüsleri içeren ondört cins vardır; *Ephemerovirus*, *Lyssavirus*, *Nucleorhabdovirus*, *Vesiculovirus*, *Perhabdovirus*, *Sigmavirus*, *Sprivirus*, *Tupavirus*, *Hapavirus*, *Ledantevirus*, *Sripuvirus*, *Tibrovirus*, *Almendravirus* ve *Novirhabdovirus* cinsidir. Bitkileri enfekte eden virüsleri ise; *Dichorhavirus*, *Varicosavirus*, *Cytorhabdovirus* ve *Nucleorhabdovirus* cinsidir. Novirhabdovirus cinsi, önemli balık patojenleri olan *Piscine novirhabdovirus*, *Hirame novirhabdovirus*, *Snakehead novirhabdovirus* ve *Salmonid novirhabdovirus*'leri içerir (ICTV, 2016).



Şekil 1. *Rhabdoviridae* ailesi (ICTV, 2016).

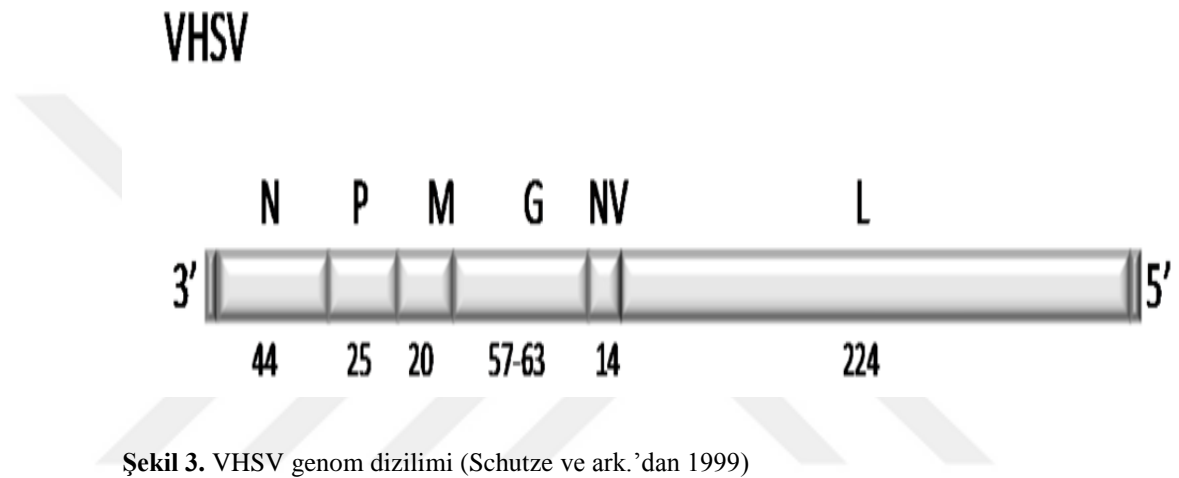
Rhabdovirus virionları, yaklaşık 45-100 nanometre (nm) çapında ve 100-430 nm uzunluğundadır ve 5-10 nm uzunluğunda glikoprotein peplomer içeren bir zarf ile çevrili, helezonik sarılı silindirik nükleokapsitten oluşur. Genom, 11-15 kilo baz (kb) boyutunda doğrusal, negatif polariteli, tek sarmallı RNA molekülüdür. Rhabdoviruslar, ısıya ve ultraviyole ışığına karşı duyarlıdır. Kuduz ve veziküler stomatit virusları, deterjan bazlı dezenfektanlar tarafından kolaylıkla etkisiz hale getirilir. Canlı balık yumurtalarının yüzeyinde meydana gelen balık rhabdoviruslarının etkisini azaltmak veya ortadan kaldırmak için iyot içeren preparatlar dezenfektan olarak uygulanırlar (Bowen, 2011; OIE, 2017).



Şekil 2. Rhabdovirusun şematize görüntüsü (Fauquet ve ark.'dan, 2005)

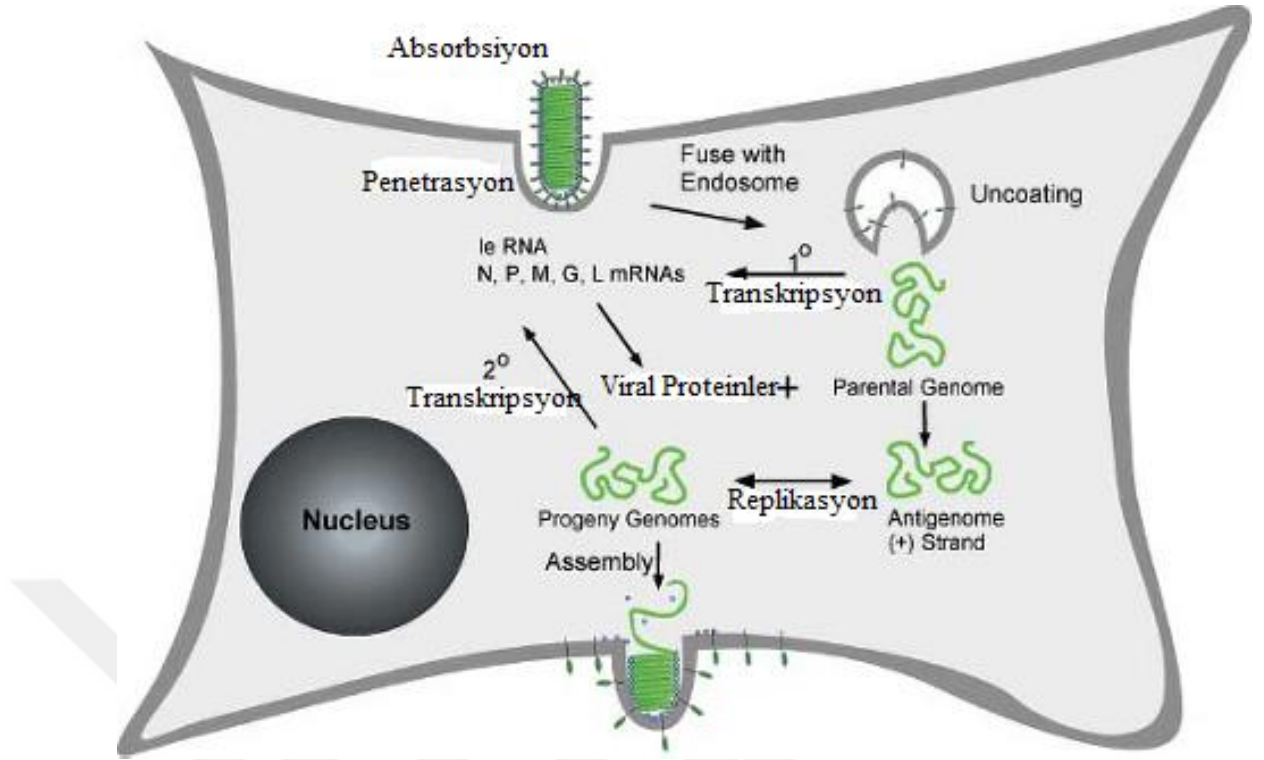
Novirhabdovirus cinsinin tüm üyeleri balık patojenleridir. *Hirame novirhabdovirus* (HIRVV), *Snakehead novirhabdovirus* (SHRV), *Piscine novirhabdovirus* (VHSV; Viral hemorajik septisemi virusu), *Salmonid novirhabdovirus* (IHNV; Enfeksiyöz hematopoietik nekroz virusu), Spring viremia of carp virus (SVCV; Sazanların bahar viremisi) olmak üzere beş önemli türü vardır (ICTV, 2016). Balık viruslarının optimal replikasyon sıcaklığı 12-25°C arası olup, 20-30°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda inaktive gösterdiği bildirilmiştir. Balık rhabdovirusları zoonotik değildirler (Gadd, 2013).

Virusun gen dizilimi 3'-N(nükleoprotein)-P(polimeraz bağımlı fosfoprotein)-M(matrix)-G(glikoprotein)-L(RNA bağımlı polimeraz)-5'şeklindedir. N, viral nükleokapsit'in ana bileşenini kodlayan nükleoprotein genidir. P, viral polimerazın bir ko-faktörüdür. M, nükleokapsite ve glikoproteinin sitoplazmik alanına bağlanarak virionun tomurcuklanmasını kolaylaştıran iç virion proteinidir. G, virion yüzeyindeki trimerleri oluşturan glikoproteindir ve aşı kaynaklı bağışıklığın hedefi olan nötralize edici epitoplar içerir. L, transkripsiyon ve RNA replikasyonunda işlev gören RNA'ya bağlı RNA polimerazdır.



Novirhabdovirus olan VHSV, IHNV'nin dışında, diğer rhabdoviruslara göre yapısal olmayan glikoprotein (G) ve polimeraz (L) geni arasında NV (protein nonvirion) geni bulunmaktadır. Virionlar ayrıca lipid içerir, bileşimleri konak hücre membranlarının bileşimini yansıtır ve karbonhidratları glikoproteinde yan zincirler olarak gösterir (Schutze ve ark., 1999).

Virusun replikasyonu; virusun konakçı hücrelere girişi, hücre yüzeyindeki reseptörlere tutunarak endositoz yolu ile olur. Reseptör tanımlama ve konak hücreye girişten viral glikoprotein G sorumludur. Viral nükleokapsit sitoplazmaya bırakılır ve replikasyon gerçekleşir. Proliferasyon önce viral polimeraz aracılığıyla genomik RNA'dan haberci RNA (mRNA) transkripsiyonunu içerir. Daha sonra viral genler sentezlenir. Viral genomik RNA ve yeni genom replikasyonu ile tamamlanır.



Şekil 4. Rhabdovirus'un replikasyon siklusu (Flood'dan, 2013)

Replikasyona uğrayan virusun enfeksiyözitesini morfolojik olarak belirleyen çeşitli testler vardır. Bu çalışmada kullanılacak olan plak testi bunlardan biridir. Plak testi virusun saflaştırılmasını ve klonlanmasını kolaylaştırır (Herzog ve ark., 2008). Enfekte olmuş hücrelerde replikasyon-lizis enfeksiyon döngüsüyle beraber giderek belirginleşen ayrı plaklar oluşur. Test genellikle, hücrelerde enfekte olma ve replikasyon yeteneğini koruyan virusların nicel olarak sayısını bilmek açısından faydalıdır (Dobos, 1976; Burke ve Mulcahy, 1980; Escobar-Herrera, 2007).

Plak kantifikasyonu için kaplama materyali olarak düşük viskoziteli, sodyum karboksimetilselüloz ile muamele edilmiş, su içerisinde kolayca dağılan bir madde olan Avicel'in kullanımı, plak saflaştırması için agaroz kaplamalar daha çok tercih edilir. Agaroz kaplamalar yüksek ısıya toleransı olan türlerde daha çok tercih edilirken, ısıya duyarlı olan VHS virus hücre hatları için düşük ısıda dahi kullanılabilen kaplamalar tercih edilebilir (Matrosovich ve ark., 2006; Herzog, 2008).

2.1.4. Epidemiyoloji

Uzun yıllar yapılan filogenetik analizler sonucu yüksek virulans gösteren tatlısu alabalıklarının VHSV izolatları, yabancı alabalıkların VHSV izolatlarından

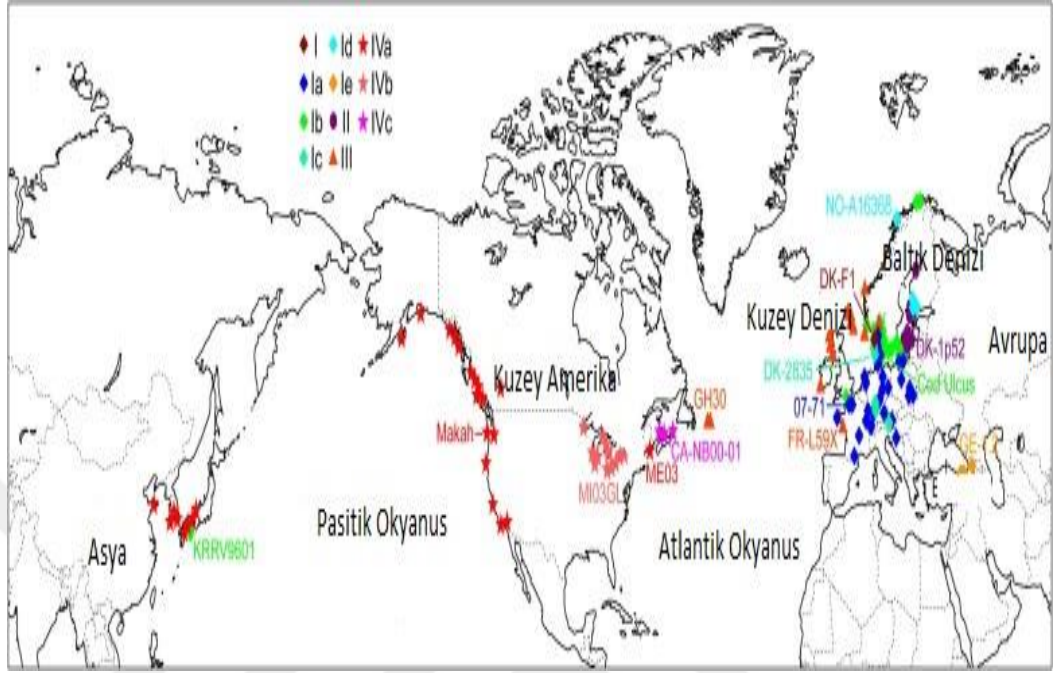
evrimleştiği ortaya konulmuştur. Buna bağlı olarak deniz balıkları ve tatlı su alabalık çiftliklerinin VHSV izolatları çok farklı virulans özellikleri göstermektedir. Deniz balığı türlerinden elde edilen izolatlar gökkuşağı alabalığında çok düşük oranlarda ölüme neden olurken, tatlı su alabalık çiftliklerinin gökkuşağı alabalığı izolatları, yüksek oranlarda ölüme sonuçlanabilmektedir (Einer-Jensen ve ark., 2014).

Tanımlanan genetik gruplandırma nötralize edici G ve N genleri dikkate alınarak serotiplendirme yapılmakta, coğrafi bölgeler bazında bu gruplandırma paralellik göstermektedir (Nishizawa ve ark., 2006; Schönherz ve ark., 2013). Bazı çalışmalara göre serotip gibi fenotipik özelliklere dayalı epidemiyolojik analizin yanıltıcı olabileceği öne sürülmüştür. Filogenetik çalışmalar ise VHSV'nin olası nükleotid değiştirme oranına dayanır. 2004 yılında yapılan bir çalışmada yetiştiriciliği yapılan tatlı su balıklarında VHSV'nin G geninde gözlenen nükleotid değiştirme hızı, denizde yaşayan balık türlerine göre yaklaşık 2-5 kat daha hızlı olduğu bulunmuştur (Einer-Jensen ve ark., 2004). Filogenetik çalışmaların sonucunda yaklaşık 60 yıl önce deniz ortamında bulunan VHSV genotip I'in Avrupa tatlı su izolatlarının orijinal rezervuarı olduğu gösterilmiştir (Einer-Jensen ve ark., 2014; Schönherz ve ark., 2013).

Virusun Danimarka'da, yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıklarında salgınlara neden olduğu belirlenmiş ve VHSV'nin ilk izolasyonu 1962 yılında yapılmıştır. 1965 yılında ise eradikasyon çalışmaları başlatılmıştır. İlk izolasyon ve tanımlamadan sonra virus, diğer Avrupa ülkelerinde (Avusturya, Belçika, Fransa, Almanya, İtalya ve Hollanda) de bildirilmiştir (Olesen, 1998). VHSV'nin yeni coğrafi bölgelerde izolasyonu, virusun yeni ekolojik alanlara yayılmasını veya daha önce keşfedilmemiş virus popülasyonlarının olabileceği için çalışmalar bu dönemde hız kazanmıştır (Einer-Jensen ve ark., 2004).

VHSV'nin, genetik olarak dört genogrubunun (I-IV) olduğu kabul edilmektedir. Genotip I'in oldukça geniş bir alana yayıldığı (Baltık Denizi, Finlandiya Körfezi, Karadeniz, Japonya gibi) ve tüm tatlı su izolatlarının bu grupta olduğu bilinmektedir. Genotip II sadece Baltık Denizi olarak adlandırılan dar bir bölgedeki balıklardan izole edilmiştir. Genotip III, İngiltere'nin ve İrlanda'nın Kuzey Denizi'nin kıyı sularından elde edilen izolatlardan ve Kuzey Fransa'da yılan balığı kaynaklı bir izolatı içermektedir. Genotip III, Kuzey Denizi, Skagerrak ve Kattegat'tan izole

edilmiştir. Genotip IV genogrubu, Kuzey Amerika, Japonya, Kore'nin Pasifik kıyılarından izole edilmiştir (Einer-Jensen ve ark., 2004; He ve ark., 2014; OIE, 2017).



Şekil 5. VHSV genotiplerinin dünyada yayılışı (He ve ark.'dan, 2014)

2014-2015 yıllarında İran'da yapılan bir çalışmada tatlı su balıklarında Genotip I izole edilmiştir. İran balıkçılık örgütüne göre alabalık çiftliklerinin çoğu Avrupa ülkesinden bu yıllarda gözlü yumurta ithal etmiştir. İdrar ve üreme sıvılarıyla saçılan virus göz önüne alındığında bu çalışmada izole edilen VHSV'nin ithal yumurta ile horizontal olarak non-epidemik bir bölgeye taşınmış olduğu kanıtlanmıştır (Ahmadivanda ve ark., 2016).

Genogrup I'in, filogenetik olarak beş alt tipi (Ia, Ib, Ic, Id ve Ie) mevcuttur. Avrupa'da gökkuşağı alabalığı çiftliklerinde salgınlara neden olan VHSV'nin neredeyse tüm izolatları, Ia ve Ic alttipidir (Canoa ve ark., 2016). Gökkuşağı alabalıklarında oldukça patojen olmasına rağmen deniz türlerinde patojenitesi oldukça düşük veya yoktur. Genotip Ib izolatları genellikle denizdeki balık türlerini enfekte eder (Schönherz ve ark., 2013). Ancak gökkuşağı alabalıklarında da önemli ölçüde ölümlere neden olduğu bildirilmiştir. Genotip Ie izolatları Gürcistan ve Türkiye'de tatlısu ve deniz çevresinden elde edilmiştir (Kalaycı ve ark., 2006; Nishizawa ve ark., 2006; Altuntas ve Ogut, 2010; Isıdan ve Bolat, 2011; Kalaycı ve ark., 2012).

Genogrup IV, üç alt tipte (IV a-c) tanımlanmıştır. IVa, Kuzey Amerika ve Asya’da deniz ve yabani balık popülasyonlarında bildirilmiştir. İlk kez 1988 yılında chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) ve coho somon (*Oncorhynchus kisutch*) balıklarından izole edilmiştir. Virus, pasifik ringa balığında (*Clupea pallasii*) oldukça yüksek mortalite gösterirken gökkuşağı alabalığına karşı düşük patojeniteye sahiptir. Kuzey Amerika’daki tatlı su ve denizde bulunan Genogrup IVb izolatları, birçok balık türünde büyük ölçekli epidemilere neden olmasına karşın gökkuşağı alabalıklarında fazla etkili olmamıştır. Genotip IVc, Kuzey Amerika’nın Atlantik kıyı bölgesinden balıklardan izole edilmiştir (Campbell ve ark., 2011; Pham ve ark., 2013; Schönherz ve ark., 2013; Ahmadivanda ve ark., 2016).

OIE verilerine göre rezervuar olabilecek balık türleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 1.VHSV’ye duyarlı balık türleri (OIE, 2017)

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) kurallarına göre hassas olan balık türleri			
Sınıf	Aile	Yaygın İsmi	Latince İsmi
Salmoniformes (salmon)	Salmonidae (salmonids)	Gökkuşağı alabalığı	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
		Chinook somonu	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>
		Coho somonu	<i>Oncorhynchus kisutch</i>
		Atlantik somonu	<i>Salmo salar</i>
		Kahverengi alabalık	<i>Salmo trutta</i>
		Gölge balığı	<i>Thymallus thymallus</i>
		Beyaz balık	<i>Coregonus lavaretus</i>
		Beyaz balık	<i>Coregonus</i> spp.
		-	<i>O. mykiss</i> × <i>O. kisutch</i>
		-	<i>O. mykiss</i> × <i>S. fontinalis</i> triploid
-	<i>O. mykiss</i> × <i>S. alpinus</i> triploid		
Esociformes	Esocidae	-	<i>Esox masquinongy</i>
		Kuzey turnası	<i>Esox lucius</i>
Clupeiformes	Clupeidae	Atlantik ringa balığı	<i>Clupea harengus</i>
		Pasifik ringa balığı	<i>Clupea pallasii</i>
		Güney Amerika sardalyası	<i>Sardinops sagax</i>
		Avrupa çaçabalığı	<i>Sprattus sprattus</i>

Gadiformes (morina)	Gadidae	Atlantik morina	<i>Gadus morhua</i>
		Poor morina	<i>Trisopterus minutus</i>
		Mezgit	<i>Merlangius merlangus</i>
		Mavi mezgit	<i>Micromesistius poutassou</i>
		Norveç mezgiti	<i>Trisopterus esmarkii</i>
		Alaska morinası	<i>Theragra chalcogramma</i>
	Lotidae		<i>Enchelyopus cimbrius</i>
		Burbot	<i>Lota lota</i>
	Merlucciidae	Kuzey Pasifik barlamı	<i>Merluccius productus</i>
Pleuronectiformes (yassı balık)	Pleuronectidae	Pisi balığı	<i>Limanda limanda</i>
		Pisi balığı	<i>Platichthys flesus</i>
		Avrupa pisibalığı	<i>Pleuronectes platessa</i>
		Görland trança balığı	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>
		Atlantik trança balığı	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>
	Scophthalmidae	Kalkan	<i>Scophthalmus maximus</i>
	Paralichthyidae	Japon pisi balığı	<i>Paralichthys olivaceus</i>
Osmeriformes	Argentinidae		<i>Argentina sphyraena</i>
	Osmeridae (smelt)	Gümüş balığı	<i>Hypomesus pretiosus</i>
Perciformes	Ammodytidae		<i>Ammodytes hexapterus</i>
		Yılanbalığı	<i>Ammodytes</i> spp.
		Pasifik yılanbalığı	<i>Ammodytes personatus</i>
	Gobiidae	Kayabalığı	<i>Pomatoschistus minutus</i>
		Kayabalığı	<i>Neogobius melanostomus</i>
	Embiotocidae	Parlak levrek	<i>Cymatogaster aggregata</i>
	Sciaenidae		<i>Aplodinotus grunniens</i>
	Scombridae	Pasifik uskumrusu	<i>Scomber japonicus</i>
	Percidae	Sarı levrek	<i>Perca flavescens</i>
Moronidae (temperate bass)	Avrupa levreği	<i>Dicentrarchus labrax</i>	
Gasterosteiformes	Gasterosteidae	Dikenli balık	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
Cypriniformes (sazan)	Cyprinidae (sazan)	Golyan balığı	<i>Pimephales promelas</i>
Petromyzontiformes (bofa balığı)	Petromyzontidae (bofa balığı)	Avrupa bofa balığı	<i>Lampetra fluviatilis</i>

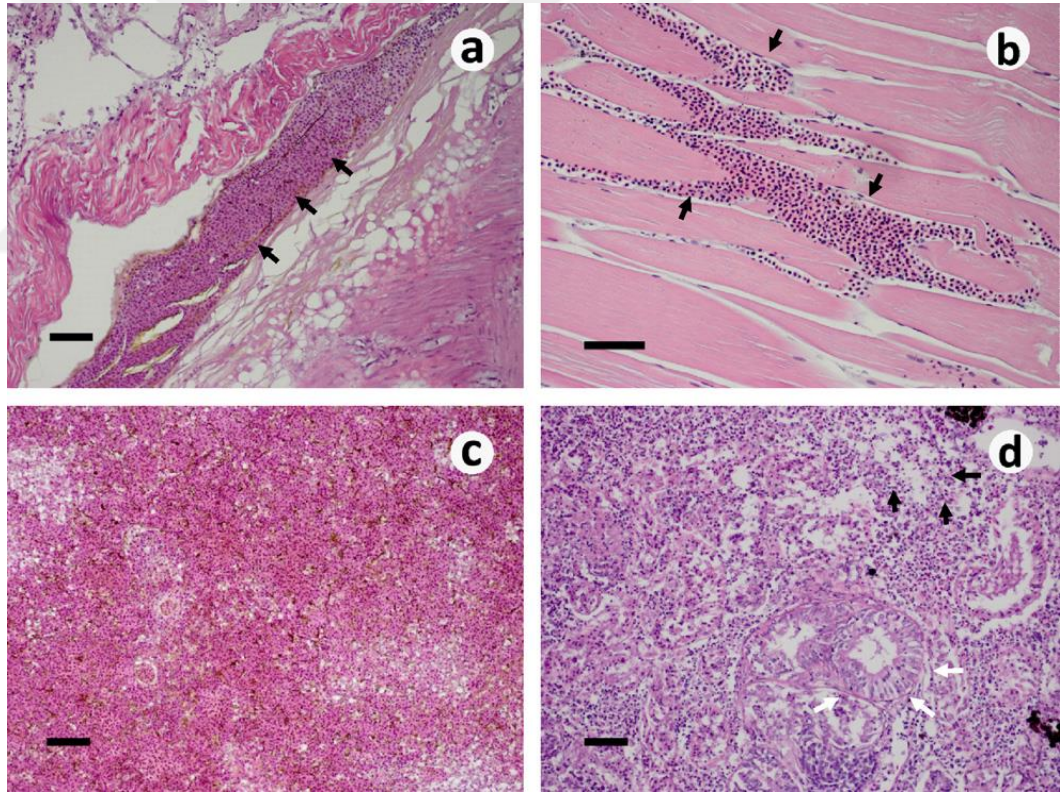
2.1.5. Patogenez

Virus, genellikle kaslarda ve iç organlarda endotelial kan damarlarını hedef alır ve peteşiyal ya da ekimatöz hemorajiler oluşturur. Ancak enfeksiyonun şiddeti ve gelişimi virus genotipine, balığın türüne, yaşına, stres düzeyine, sıcaklık ve diğer çevresel etkilere göre şekillenmektedir (Chilmonczyk ve Monge, 1995; Purcell ve ark., 2012; Pham ve ark., 2013; Ahmadivanda ve ark., 2016; OIE, 2017).

Novirhabdovirus'lerin konağa en önemli giriş alanı balığın yüzgeç bölgesidir. Yüzgeçler VHSV replikasyonunda önemli rol oynarlar (Quillet ve ark., 2001). Ayrıca

yapılan bir çalışmada VHSV genotip I izolatlarının solungaç epiteli ve dalağın makrofajların erken hücre hedefleri olduğu bildirilmiştir (Pham ve ark., 2013). Başka bir deneme çalışmasında VHSV'nin 4 farklı dokudaki oranları karşılaştırılmış olup böbrek ve beyin dokusuna göre kalp ve gonad dokularında daha yüksek oranlarda virus tespit edilmiştir (Nishizawa ve ark., 2006).

Diğer bir deneysel çalışmada VHSV'nin böbrek, dalak, timus ve lökositlerde replike olduğu, lenfositlerin VHSV'ye karşı en az duyarlı hücre olduğu gösterilmiştir. Deneysel enfeksiyon sonrası 6. saatte lökositlerde virus bulunması, lökositlerin balık rhabdoviruslarının ilk hedefleri arasında olduğunu göstermiştir. VHSV'nin makrofajlar ve fagositler üzerinde de baskılayıcı bir etkisinin olduğu ve fagosit sayısının azalmasına ya da fagositik işlevlerin bozulmasına neden olduğu belirlenmiştir (Chilmonczyk ve Monge, 1995).



Şekil 6.a; mesane duvarındaki yaygın hemoraji. b; kas dokudaki eritrosit infiltrasyonu. c; dalak dokusundaki yaygın kanama bölgesi. d;siyah oklar böbrekteki hemopoetik deplasyon, beyaz oklar tubuler epitelindeki nekroz bölgeleri (Kim ve Faisal'dan, 2011)

2.1.6. Klinik Belirtiler

VHS'nin klinik belirtileri, virusun genotipine, balık türüne ve yaşına, stres faktörlerine, sıcaklığa ve diğer çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Enfeksiyonun akut formunda deri renginde koyulaşma, anemi, ekzoftalmi, ülserasyon, solungaçlarda belirgin soluklaşma ve epidermal hemoraji görülmektedir. Akut enfeksiyonlar genellikle yüksek mortalite ile sonuçlanır (Chilmonczyk ve Monge, 1995; Isshiki ve ark., 2001; Ahmadivanda ve ark., 2016).

Kronik formdaki balıklar ise düşük mortalite göstermesine karşın çoğu zaman taşıyıcı olurlar ve enfeksiyonu yaymaya devam ederler. Bazı kronik enfeksiyonlarda zamana bağlı olarak konakta nerval belirtiler gözlemlenebilir. Bu belirtiler balığın spiral şekilde yüzmesi ile karakterizedir. Peritonda ve kasta dağılmış olan asit ve peteşi varlığı da VHSV enfeksiyonunun tipik bir semptomudur (Skall ve ark., 2005; Bowen, 2011; Kim ve Faisal, 2011; Gadd, 2013; OIE, 2017).

2.1.7. Teşhis

Teşhis genellikle klinik belirtiler, histopatolojik bulgular, virusa duyarlı hücre hatlarında izolasyon, serolojik ve moleküler testler kullanılarak yapılır. Virus, Epithelioma Papulosum Cyprini (EPC), Bluegill Fry (BF-2), Fathead Minnow (FHM), Chinook Somon Embriyo (CHSE-214) ve Rainbow Gonad (RTG-2) gibi birçok hücre hattında üremeyebilmektedir. Virusun üremesi için uygun hücre kültürü ortamı pH 7,1 ve 15°C sıcaklık olarak belirlenmiştir. EPC hücre hattının pasajlanması ile VHSV'nin replikasyonu üzerindeki etkisini öğrenmek amacıyla yapılan bir çalışmada, yüksek pasajlama (200 üzeri) ve düşük pasajlamanın (5-15 arası) titre üzerindeki etkisi ve apoptozsizin ilerlemesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmada VHSV titresi EPC hücrelerinin yüksek pasajlamalarının düşük pasajlamaya göre belirgin bir şekilde (yaklaşık 3 kat) yüksek bulunmuş, yine yüksek pasajlamanın VHSV ile enfekte EPC hücrelerinde apoptozisi geciktirdiği ve VHSV titresindeki belirgin artış belirlenmiştir (Kim ve ark., 2016).

BF-2 ve RTG-2 gökkuşuğu alabalıklarının tatlısu izolatları için en duyarlı hücre hatları olduğu (Gadd, 2013), EPC hücre hattının ise genotip IV için oldukça duyarlı olduğu bildirilmiştir (OIE, 2017).

Serolojik olarak Plak nötralizasyon testi (PNT), Immünoblot, Floresan antikor testi, Enzime bağılı immünosorbent testi (ELISA) ve Sekans analizi yöntemleri tanıda belirleyicidir (OIE, 2017).

Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) moleküler olarak en spesifik ve en hızlı yöntemlerden biridir. VHSV genomunda N geni korunmuş bölgedir ve viral enfeksiyon sırasında en fazla bulunan genidir. Bu nedenle VHSV'yi saptamak için kullanılan moleküler analizlerde ilk hedeflenen bölgelerden birisidir. Bunun yanı sıra G genlerinin RT-PCR amplifikasyonunda spesifik ve duyarlı bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Gadd, 2013).

Real-time Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (rRT-PCR) hızlı, hassas, çapraz bulaşma riskini azaltan, spesifik genotiplendirme yapılabilen, birçok numunenin kısa sürede, aynı anda analiz edilmesine imkan veren bir yöntemdir. Konvansiyonel PCR ile yapılan virus analizlerinin en büyük dezavantajı, pozitif sonucun, sadece viral nükleik asit varlığına dayanmasıdır. Virusun serotipik veya genotipik enfektivitesi ile ilgili herhangi bir bilgi sağlamamaktadır (Purcell ve ark., 2006; Biacchesi, 2011; Blanda ve ark., 2013; Kim ve ark., 2014).

Çalışmamızda yöntem olarak kullandığımız plak testi, hücre kültürü virionlarının ve antiviral maddelerin miktarının tespiti için en yaygın kullanılan metottur. Plaklar ölü hücrelerin ya da enfekte hücrelerin alanı olarak açığa çıkar. Bazı viruslara (VHSV, IHNV) standart sıvı kültür ortamında plak testi yapılabilir, çünkü bu virusların doğrudan hücreden hücreye yayılımı lokalize plakların oluşmasını sağlar. En yaygın yöntem, kültür ortamını bir agar (veya agaroz) jel ile katılaştırmaktır. İlk virus ekimi ve sabitleme tabakasının uygulanmasının ardından, viral enfeksiyon ve replikasyonu çevreleyen tabaka ile sınırlandırıldığı için, bireysel plaklar veya hücre ölümü bölgeleri gelişmeye başlayacaktır. Enfekte olmuş hücreler, replikasyon-lizis enfeksiyon döngüsünde devam eder ve giderek daha belirginleşen ayrı plaklar oluşur. Virusun hücrelere bağlanmasından hemen sonra hücre kolonileri ve virus için daha fazla besleyici ortam (medium) ilave edilerek immobilize edilir. Bu hücreler daha sonra, sitopatik bir etki gözlenene kadar, birkaç gün boyunca inkübe edilir. Enfekte hücrenin sayısı, sitopatik etki gösteren plaktaki koloni sayısından hesaplanabilir. Test genellikle, hücrelerde enfekte olma ve replikasyon yeteneğini koruyan virüslerin nicel olarak sayısını bilmek açısından faydalıdır. Testin çeşitli sakıncaları da vardır. Öncelikle testin

gerçekleştirilmesi için önemli bir süre gerektirir. Virus bulaşmış hücreler görsel olarak görülebilen sitopatik etki oluşturmak için yeterli süre inkübe edilmelidir. Bir diğer dezavantajı, birçok virus bu yöntem kullanılarak görsel olarak yeterli hücre hasarına neden olmaz. Son olarak ölçümdeki kullanıcı değişkenliği sebebiyle plakların ölçümü konusunda belirsizlik olabilmektedir (Burke ve Mulcahy, 1980; Matrosovich ve ark., 2006; Herzog ve ark., 2008).

Yapılan bir çalışmada kaplama materyali olan agaroz ve karboksimetil-selülozun kullanımı karşılaştırılmıştır. Karboksimetil-selüloz, viskoziteyi arttıran zararsız bir reaktiftir. Bu, virusun yayılması önler ve aynı zamanda doku kültürü plakalarından kolayca çıkarıldığı için tek tabaka bütünlüğünü korur. Agaroz ise plakalardan çıkarıldığında, tek tabaka yaygın şekilde zarar görür ve bu da plak kantifikasyonunda değişikliğe neden olur. Hücre fiksasyon çözeltisi karboksimetil-selüloz plaklara direkt olarak eklenebilir, bu durum fiksasyon süresini önemli ölçüde azaltır. Çalışmadaki bulgulara karboksimetil-selüloz ile kaplı plakların agarozda elde edilen plaklara kıyasla daha küçük olduğu fakat viral titrelerin eşdeğer olduğu saptanmıştır (Escobar-Herrera ve ark., 2007).

Burke ve Mulcahy'nin (1980) yaptığı bir çalışmada, fiksasyon sonrası 1-3 günlük hücre tabakalarında oluşan plaklar, 4-10 günlük katmanlardaki plaklara göre daha büyük olduğu ve sayımının daha kolay olduğu gözlenmiştir. Eskiyen hücre katmanları, genellikle ilk 10 güne kadar daha fazla plak üretmiş, ancak sitopatik etki alanları net olmamıştır (Burke ve Mulcahy, 1980).

2.1.8. Bağışıklık

DeneySEL enfeksiyonlar, G proteininin koruyucu immuniteye katılan tek protein olduğunu ve VHSV'nin virulansında önemli rol oynadığını göstermiştir. G proteinin erken immun yanıtı indüklediğini, indüklenen mediatörlerin antiviral yanıtı (interferon-IFN) oluşturduğu gözlenmiştir. VHS'ye karşı DNA aşılamlarında plazmid ile birlikte kullanılan bu gen oldukça yüksek başarı sağlamıştır. Yapılan çalışmalarda DNA aşısı uygulanan balıkların Mx proteinleri ölçüldüğünde artan IFN yanıtı olduğunu gösterilmiştir (Campbell ve ark., 2011; Najib ve ark., 2016).

VHSV Nv proteininin, konak hücrelerde IFN tepkisinin bastırma ve apoptozu geciktirme yeteneğine sahip olduğu kanıtlanmıştır (Thoulouze ve ark., 2004; Ammayappan ve Vakharia, 2011). Viral enfeksiyona karşı apoptoz yoluyla konak

hücrelerin erken ölümü konağın savunma mekanizmasıdır. Viral partiküllerin çoğaltılması ve üretimi neredeyse tamamı engellenerek virus çoğalması inhibe edilebilir. Pek çok virusun viral replikasyonu uzatmak için apoptozu geciktirmek ya da önlemek gibi stratejiye sahip olduğu bilinmektedir. Gecikmiş apoptozis ve doğuştan gelen konakçı tepkisinin baskılanması viral enfeksiyonun erken evresinde özellikle önemlidir (Ammayappan ve Vakharia, 2011; Alvarez-Torres ve ark., 2016; Durmaz ve Albayrak, 2016).

Yapılan son çalışmalara göre M proteininin reverse genetik uygulamalarıyla konak hücrelerinin aktivasyonunu önleyebileceği belirtilmiştir (Purcell ve ark., 2012).

Balık rhabdoviruslarına karşı balıkta doğuştan gelen immun yanıt olarak sitokinler (tip1 IFNs ve tip2 IFNs), kemokinler bulunmaktadır. Tip I interferonlar (IFN), RNA gibi viral replikasyon ürünleri ile viral enfeksiyon sırasında indüklenen bir grup antiviral sitokindir. IFN'ler biyolojik işlevlerini spesifik hücre yüzeyi reseptörlerine bağlayarak uygularlar. IFN konak hücrede antiviral, antiproliferatif ve immüno-düzenleyici duruma yol açan çok sayıda IFN-uyarılmış gen (ISG) ekspresyonunu indükler. Bunlar arasında yer alan Mx proteinleri virüslere karşı hücrenin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (Canoa ve ark., 2016). Çekirdekte veya sitoplazmada hızla birikirler, oligomerlerde kendiliğinden bir araya gelirler ve viral repliklerle etkileşime girerler. Bununla birlikte virüsler, enfeksiyonun erken dönemlerinde virus çoğalmasını durduracak IFN yolunu engellemek ve müdahale etmek için geniş bir strateji yöntemi geliştirmişlerdir. Rhabdoviruslar replike olabilmek ve enfeksiyon oluşturmak için IFN yanıtını baskılaması gerekmektedir (Purcell ve ark., 2012; Kim ve ark., 2013; Alvarez-Torres ve ark., 2016).

Edinilmiş bağışıklık sistemi de anti-rhabdoviral immunitenin önemli bir bileşenidir. Edinilmiş bağışıklık sistemini B ve T hücrelerinden oluşturmaktadır. Bu hücreler spesifik viral antijenler olarak tanımlanır. B hücreleri VHSV'nin G proteinine karşı nötralize edici antikorlar üreterek enfeksiyona karşı koruma sağlarlar (Purcell ve ark., 2012).

2.1.9. Koruma Kontrol

VHS, ülkemizde 2005/176/EC sayılı Avrupa Birliği Komisyon Kararına paralel olarak, ihbari mecburi hastalık olarak belirlenmiştir (GTHB, 2011). Mevcut 2006/88/EC sayılı su hayvanları sağlığı AB konsey direktifi ile ülkelerin liste

hastalıklarından ari olması durumun korunması ve gözetim önerilmektedir. Gözetim hastalıklardan ari olabilmek, hastalıklardan korunma programları ve hayvanların güvenliği uluslararası ticaret için oldukça önemlidir (Campbell ve ark., 2011).

VHS gökkuşağı alabalıklarında 1964-1974 yılları arasında Norveç'te başarılı bir şekilde eradike edilmiştir. 1980'lerin ortalarından bu yana da Norveç'te balık sağlığı hizmetleri (FHS) , su hayvanları sağlığı denetiminin vazgeçilmez bir parçası olmuştur. Ancak 2007'de Güney Batı Norveç denizinde gökkuşağı alabalıklarında VHSV teşhis edilmesiyle kontrol programları geliştirilmiştir.

Norveç'te yapılan bir çalışmada, Alan hassasiyeti (SeS), Popülasyon hassasiyeti (SEP) ve Arilik olasılığını (PFree) tahmin etmek üzere bir sitokastik (olasılıksal) simülasyon modeli geliştirilmiştir. Bu çalışmanın amacı; rutin klinik denetimlerde FHS'nin VHS tespiti performansı üzerine etkisini değerlendirmek ve FHS denetimlerinde riskli bölgelerin öncelik etkinliğini araştırmak olarak belirlenmiştir. Model; bölge, türler, alandaki üretim yoğunluğu ve biyogüvenlik düzeyi (balıkların yer değiştirmesi dahil) üzerinden risk faktörlerini belirlemekte, eğer alanda enfeksiyon varsa numunelerin klinik belirtilerine ve laboratuvar testlerine göre tahmin geliştirmektedir. Çalışma verilerine göre bu modelin VHSV kontrolünde oldukça etkili olduğu gözlenmiştir (Lyngstada ve ark., 2016).

VHS oldukça bulaşıcı bir enfeksiyondur. Hastalığın erken dönemlerde bile yüksek mortalite ve klinik belirtiler vardır. Hastalığın klinik bulgulara dayalı gözetime ve şüpheli numunelerin laboratuvar testlerine tabii tutulması korunma ve kontrolde oldukça önemlidir.

2.2. AMAÇ

VHS virüsü alabalıklarda yüksek mortaliteye ve önemli ekonomik kayıplara neden olan bir virustur. Farklı balık türlerinde farklı virulans gözlemlendiği gibi farklı izolatlarında genotipik karakterlerine göre farklı virulans göstermektedir. Bu projenin amacı; deniz ve tatlı su balıklarından izole edilen yerli viral hemorajik septisemi virus izolatlarının plak testiyle çap büyüklüğüne dayalı fenotipik karakterine göre sınıflandırılmasını, sınıflandırılan izolatların saflaştırılmasını, saflaştırılan izolatların virulans üzerine etkisinin alabalıklarda araştırılması hedeflenmektedir.



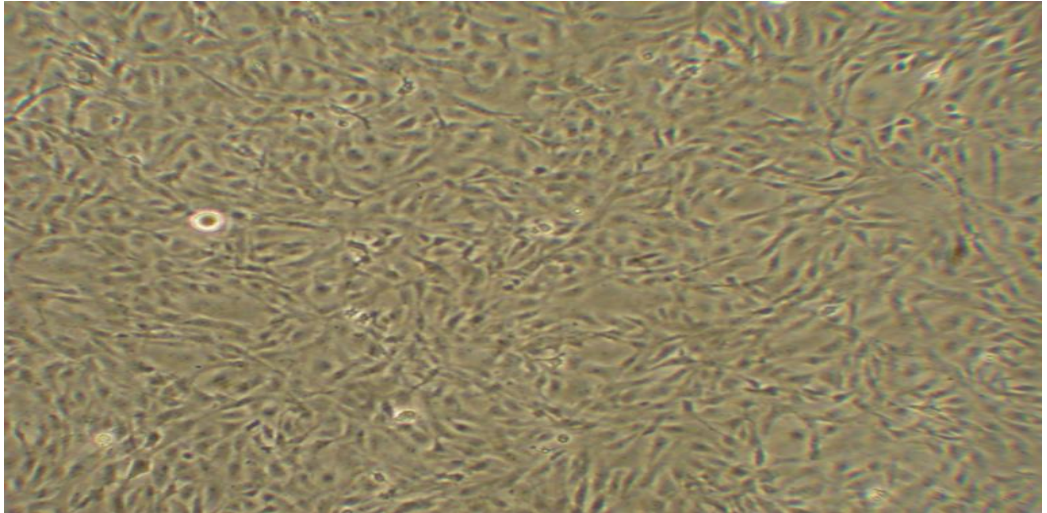
3. MATERYAL METOT

3.1. Materyal

“Viral Hemorajik Septisemi Virusunun (VHSV) Fenotipik Karakterinin Virulans Üzerine Etkisinin Araştırılması” başlıklı yüksek lisans tez konusu T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 29.07.2016 tarih ve 7-1 sayılı izni ile yürütülmüştür.

3.1.1. Hücre ve Virus

Anabilim Dalımız hücre ve virus koleksiyonunda bulunan RTG-2 hücresi ve Bolu VHSV izolatu (Genbank No: KM972678) Ulusal Referans laboratuvar olan Bornova VKAEM'den, TR-WS13G izolatu (Genbank No: KM972680) ise Trabzon SÜMAE'den temin edildi. VHS virus izolatlarının hücre kültüründe üretilmesinde RTG-2 devamlı hücre hatları kullanıldı. RTG-2 devamlı hücre kültürleri -86°C'lik derin dondurucudan çıkartılarak içerisinde %10 fotal dana serum, %1 antibiyotik+antimikotik (10000 IU/ml penicilline, 10 mg/ml streptomisin, 0,025mg/ml amphotericin B, ve %1 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) bulunan Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM)/ Leibovitz's L-15 (L-15) kullanılarak 25 ve 75 cm² yüzeyli doku kültürü flasklarında soğutmalı inkübatör içinde 20-22°C'de üretildi.



Şekil 7.RTG-2 hücresi

3.1.2. RNA Ekstraksiyonu, rRT PCR Kitleri, Primerler ve Prob

RNA ekstraksiyonu ticari olarak temin edilen ekstraksiyon kiti (Qiagen, RNeasy Mini kit, Cat No: 74106, Hilden, Almanya) kullanıldı. Yine çalışmalarda ticari olarak temin edilen tek aşamalı PCR kiti (Rotor-Gene Probe RT-PCR kit, Cat No: 204574, Qiagen, Hilden Almanya), primerler ve prob kullanıldı. rRT-PCR metodu için kullanılan primerler ve probun orjinleri ile lokalizasyonları ile ilgili bilgiler Tablo 2’de sunuldu. Amplifikasyonlarda, G genine özgül primerler ve prob kullanıldı. Testte pozitif referans ve konsantrasyonu ortaya koymak için virusun tüm G genini içeren plazmid (pGEM-T Easy vektör, Promega, ABD) ve negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

Tablo 2.Primer ve problemlerin dizini ve lokalizasyon bölgeleri

Primer ve Prob Adı	Dizin 5’-3’	Lokalizasyon Bölgesi (145bp)
VHSV-F	5’ CATCCATCTCCCGCTATCAGT 3’	3204–3224
VHSV-R	5’ AGACAGTTTCGCCTCTAAGAT 3’	3348–3328
VHSV-P	FAM-5’ AGCGTCTCCGCAGTCGCGAGTGG -3’ TAMRA	3229–3251

3.1.3. Balık Örnekleri

Bu amaçla daha önceden rutin kontrolleri yapılan ve geçmişinde VHS bildirim bulunmayan Kızılırmak üzerinde bulunan Derbent Baraj gölünde faaliyet gösteren ticari alabalık işletmelerinde 30’arlık örnekler alınarak real-time PCR metodu ile VHSV varlığı araştırıldı. Örneklemeler sonucunda VHSV varlığı tespit edilmeyen bir işletmeden sağlanan balık örnekleri deneme çalışmalarında kullanıldı. 60-100 gram ağırlığındaki 150 adet Gökkuşuğu alabalığı, Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü balık hastalıkları epruvasyon ünitesinde bulunan kapalı sistem balık tanklarına uygun koşullarda nakil edildi. Deneme için kullanılacak balıklar adaptasyon için 7 gün tanklarda bekletildi. Balıklara uyum sürecinde ve deneme enfeksiyon boyunca günlük takibi ve rutin beslemesi yapıldı.



Şekil 8. Denemeye alınan gökkuşağı alabalığının görüntüsü



Şekil 9. Balık denemelerinin yapıldığı su ürünleri deneme ünitesi

3.1.4. Deneme Ünitesi Su değerleri

Deneyel enfeksiyon süresinde su kalitesine ait parametreler Tablo 3 ve 4'te sunulmuştur.

Tablo 3. Deneme ünitesinin ısı ve O₂ değerleri

Su sıcaklığı °C	Oksijen Mg\ Lt
13,0	8,4

Tablo 4. Deneme ünitesinde kullanılan H₂O kimyasal değerleri

Parametreler	Ortalama	Parametreler	Ortalama
pH	6,5 – 9,5	Kadmiyum	5 µg/L
İletkenlik	2500 µS/cm (25°C)	Klorür	250 mg/L
Bulanıklık	5 NTU	Krom	50 µg/L
Toplam Sertlik	Fr°	Kurşun	10 µg/L
Renk	Kab.Ed.D.	Mangan	50 µg/L
Koku	Kab.Ed.D.	Nikel	20 µg/L
Tat	Kab.Ed.D.	Nitrat	50 mg/L
Alüminyum	200 µg/L	Nitrit	0,50 mg/L
Amonyum	50 µg/L	Oksitlenebilirlik	5 mg/L O ₂
Antimon	5 µg/L	Selenyum	10 µg/L
Arsenik	10 µg/L	Siyanür	50 µg/L
Bakır	2 mg/L	Sodyum	200 mg/L
Bor	1 mg/L	Sülfat	250 mg/L
Civa	1 µg/L	TOC	Kab.Ed.D.
Demir	200 µg/L	Koliform	0/100 ml
Florür	1,5 mg/L	Enterokok	0/100 ml
E-Koli	0/100 ml		

3.2. Metot

3.2.1. Virus İzolatlarının Üretilmesi

Projede kullanılan VHS virus izolatları RTG-2 hücre kültüründe üretildi. Hücre kültürleri %10 FDS, % 1 antibiyotik+antimikotik ve %1 hepes içeren DMEM/L-15 kullanılarak üretildi. Hücre kültürlerinin tek katmanlı üremeleri %80-90 oranına ulaşınca hücre vasatları dökülerek viruslar 1:10 oranında inokule edildi. Bir saat adsorbsiyondan sonra hücre kültürüne %2 FDS, %1 hepes ve %1 antibiyotik+antimikotik içeren virus üretme vasatı ilave edildi. Hücre kültürleri, % 90-95 oranında CPE görüldükten sonra -74 °C'de donduruldu ve sonra hızla çözdürülerek 2000xg'de, +4°C'de 15 dakika santrifüj edilerek klarifikasyon işlemi yapıldı. Süpernatantlar 2'şer ml'lik hacimlerde bölünerek -86°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı.



Şekil 10. VHSV'nin RTG-2 hücresinde CPE görüntüsü

3.2.2. Virus Mikrotitrasyon Testi

Titrasyon, virusların DKID₅₀ dozunu belirlemek amacıyla yapıldı. İki ayrı izolat için iki tane 96 gözlü mikrotitrasyon pleytine, virusun log₁₀ tabanına göre sulandırılmış dilasyonları 10⁻¹'den 10⁻¹⁶'ya kadar 100 µl olarak eklendi. Hücre kontrol kuyucuklarına 100 µl hücre üretme vasatı, virus kontrol kuyucuklarına ise 50 µl sulandırılmamış virus ile 50 µl hücre üretme vasatı konuldu. Tüm gözlere 50 µl RTG-2

hücresi eklendi. Hazırlanan pleytler, hücrelerin tutunması için 22°C etüve kaldırıldı. 24 saatin sonunda 15-16°C olan etüve alındı ve günlük olarak CPE yönünden kontrolleri yapıldı. 7 gün inkubasyondan sonra Spaerman ve Kaerber metodu ile virusun DKID₅₀ değerleri hesaplandı.

3.2.3. Plak Test

150 cm²'lik hücre kültür kabında çoğaltılan RTG-2 hücrelerinin medyumları uzaklaştırıldıktan sonra, 1xPBS ile yıkandı. Kaba 2 ml tripsin ilave edildikten sonra 25 C°'de 5 dakika inkube edildi. Kaba hafifçe vurularak hücrelerin zeminden ayrılması sağlandı. Kap içerisine 6 ml L-15 vasatı eklendi ve hücreler otomatik pipetör ile pipete edildi. Kabin içerisinden 1 ml alınan hücre süspansiyonu 50 ml hacimli konik bir tüpe konuldu ve üzerine 19 ml L-15 vasatı eklendi. 6 gözlü pleytin her bir gözüne 3 ml hücre süspansiyonu eklendi. Her bir izolat için ayrı pleytler hazırlandı. Pleytler 22°C'de bir gece boyunca inkube edildi. DKID₅₀'si bilinen virusun 1/10 dilasyonları L-15 vasatı ile hazırlandı. 6 gözlü makropleytin kapağı açılarak vasatı döküldü ve 1/10 dilasyonların her birinden 100 µl gözlere konuldu. 30 dakika inkubasyondan sonra her bir göze 50/50 oranında 2xL-15 ile %2 agaroz içeren soğutulmuş karışımdan 3 ml gözlere konuldu. Plastik kaplama ile kaplanan pleyt 15°C'de 3 gün inkube edildi. 3. günün sonunda 1 ml nötral red ile 9 ml 2xL-15 karışımı 37°C'de inkube edildi. 52°C'de %2'lik agaroz karışımı hazırlandı. Eşit hacimde karıştırılan agaroz ve boya karışımı katılma derecesine kadar soğutulduktan sonra her bir göze 2 ml olarak eklendi. Alimünyum folyo ile sarılan pleytte 24 saat sonra plaklar gözlemlendi. Plak sayısının en az olduğu gözdeki plakların çapları ölçülerek plaklar dar (1mm'den küçük çaplı) ve geniş (1 mm'den büyük çaplı) olarak işaretlendi. İnce uçlu enjektör yardımıyla plakların içerisine girilerek 200 µl hacminde virus toplandı. Her bir fenotipik örnek tekrar hücre kültürüne ekilerek plak testi 3 defa tekrarlandı.

3.2.4. Balıklara Virus İnokülasyonu

Balıklarda patojenite denemeleri Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Balık Hastalıkları Epruvasyon Ünitesinde bulunan kapalı sistem balık tanklarında gerçekleştirildi. Deneme için tanklara alınacak balıklar adaptasyon için 7 gün tanklarda bekletildi. Balıklara yapılacak tüm müdahalelerde, balıklar MS-222 (30mg/lt) ile anesteziye alınarak enjeksiyon uygulandı. Balıklar deneme aşamalarında adlibitum

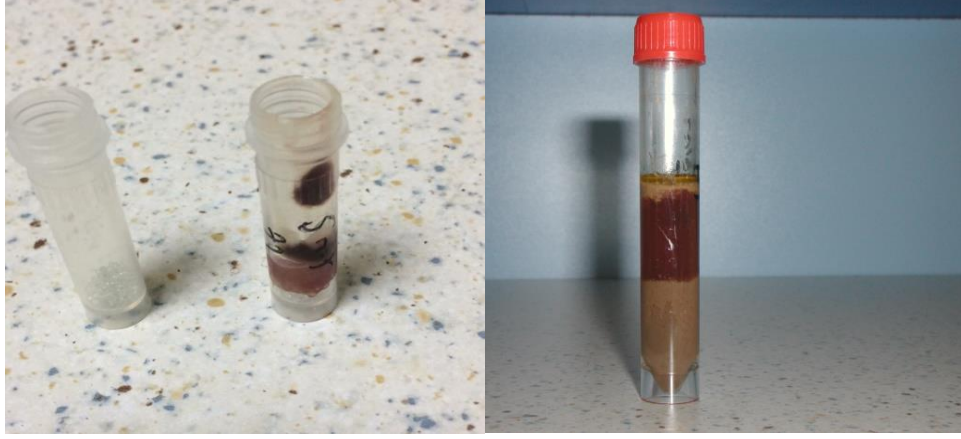
olarak ticari kuru pelet yemle beslendi. Denemeler boyunca tank suyu sıcaklıkları 13 °C olacak şekilde sabit tutuldu. Virus uygulanan balıklar 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ışık altında tutuldu. Kontrol grubundaki 30 balığa 0,1 ml PBS intraperitoneal uygulandı. 2. grutaki 30 balığa Bolu/06 geniş çaplı plak oluşturan izolat, 3. gruptaki 30 balığa Bolu/06 dar çaplı plak oluşturan izolat, 4. gruptaki 27 balığa TR-WS13G geniş çaplı plak oluşturan izolat, 5. gruptaki 27 balığa TR-WS13G dar çaplı plak oluşturan izolattan intraperitoneal yolla 1×10^4 DKID₅₀ /balık dozunda virus eprüve edildi. Balıklar 30 gün boyunca gözlemlendi. Süre boyunca enfeksiyona bağlı ölen balıklar ile süre sonunda insancıl yöntemlerle öldürülen balıkların yapılan nekropsisi sonunda karaciğer, böbrek, dalak ve kalpleri alındı.



Şekil 11. Balıklara virus inokulasyonu

3.2.5. Balık Örneklerinin Homojenizasyonu

Virus inokülasyonunu takiben ölen balıklardan karaciğer, dalak, böbrek ve kalp, tabanında cam boncuk bulunan 2 ml'lik cryo tüplere alınarak bir havuz oluşturuldu ve her bir balık bir araştırma materyali olarak değerlendirildi. Organ havuzlarına, 1/10 oranında %1'lik 10 000 IU penisilin/ml, 10 mg /ml streptomisin ve 0,025 mg/ml Amphotericin B içeren PBS eklendi ve doku parçalayıcıda homojenize edildikten sonra +4°C'de 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar toplandı ve rRT-PCR aşamasında kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.



Şekil 12. Cyro tüplere alınan organların homojenize görüntüsü

3.2.6. RNA Ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonu ticari olarak temin edilen ekstraksiyon kiti (Qiagen, RNeasy Mini kit, Cat No: 74106, Hilden, Almanya) ile üretici firmanın direktifleri doğrultusunda yapıldı. Özetle; çalışmaya başlamadan önce kit reaktifleri 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Steril mikro tüp içerisine 400 µl virus şüpheli materyal (plazma, süt ve kene homojenizatı süpernatantı) konuldu. Bunun üzerine 600 µl (hacminin %1 oranında beta merkaptotanol-β-ME içeren) RLT buffer konuldu. Örnek vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Üzerine 600 µl %70'lik etanol ilave edildi ve pipetasyon ile karışması sağlandı. Karışımın 700 µl'si 2 ml hacimli toplama tüpü içerisine yerleştirilen RNeasy spin kolonuna transfer edildi ve 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atılarak aynı işlem kalan karışım bitene kadar tekrarlandı. Bu işlemler sonunda spin kolonun yer aldığı toplama tüpü değiştirildi ve spin kolona 700 µl RW1 buffer konularak 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpü tekrar değiştirilerek spin kolonu 500 µl RPE buffer konuldu ve tekrar 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpü değiştirildikten sonra spin kolona tekrar 500 µl RPE buffer konuldu ve 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı. İşlem sonunda spin kolon 1,5 ml hacimli toplama tüpü içerisine yerleştirildi. Spin kolona RNase içermeyen steril distile sudan 50 µl konuldu ve 10000 rpm devirde 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpünün tabanında biriken RNA örneği rRT PCR çalışmalarında kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

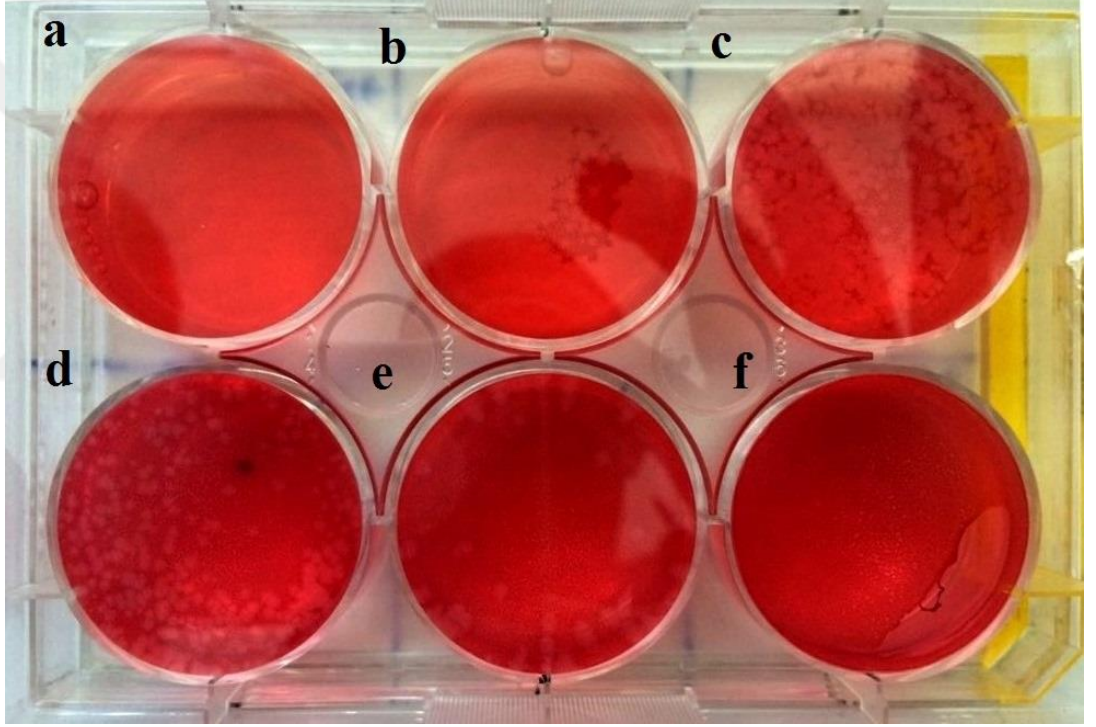
3.2.7. rRT-PCR

rRT PCR işlemleri LightCycler 2.0 (Roche, Rotkreuz, İsviçre) cihazında gerçekleştirildi. rRT PCR için ticari olarak temin edilen tek aşamalı PCR kiti üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı (Rotor-Gene Probe RT-PCR kit, Cat No: 204574, Qiagen, Hilden Almanya). Reaksiyon toplam hacmi 25 µl olarak hesaplandı. Reaksiyona giren bileşenlerin hacmi ise; 12,5 µl 2x Rotor-Gene Probe PCR master miksi, 5,25 µl distile su, 0,8 µl'şer primerler (konsantrasyonu 10 pmol), 0,4 µl prob (konsantrasyonu 10 pmol), 0,25 µl enzim miksi ve 5 µl RNA olarak hesaplandı. Örnekler, buz aküsü üzerinde hazırlanarak cihaza özel cam kapillarlara konulduktan sonra cihazın karoseline yerleştirildi. Cihazda ısıl koşullar şu şekilde ayarlandı: revers transkripsiyon basamağı için 50⁰C'de 10 dakika, reverse transkriptaz enzim inaktivasyonu için 95⁰C'de 5 dakika inkübe edildi. Bunu takiben 40 siklus boyunca, ön denatürasyon için 95⁰C'de 5 saniye, annealing basamağı için 60⁰C'de 10 saniye inkübasyona bırakıldı. Son olarak ise soğutma basamağında 12⁰C'de süresiz bekletildi. Sonuçlar gerçek zamanlı olarak bilgisayar ekranında takip edildi.

4.BULGULAR

4.1. Plak Testi Çalışma Sonuçları

Plak testi sonucunda; her bir izolat için 1mm'nin altındaki plakları dar plak, 1mm'nin üstündeki plakları geniş plak olarak tiplendirildi. Bu işlem 3 kez tekrarlanarak virus izolatlarının saflaştırılması sağlandı. Dar ve geniş plak oluşturan virusların titreleri ayrı ayrı hesaplandı. Üçüncü plak saflaştırma testinden sonra virusların titresini VHSV Bolu-geniş plak için $10^6/0,1$ ml, Bolu-dar plak için $10^5/0,1$ ml; TR-WS13G -geniş plak için $10^7/0,1$ ml, TR-WS13G -dar plak için $10^{5,5}/0,1$ ml olarak hesaplandı. \log_{10} tabanına göre sulandırılan virusların plak görüntüleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 13. Plak testi sonucu (a; 10^{-1} dilüsyon b; 10^{-2} dilüsyon c; 10^{-3} dilüsyon d; 10^{-4} dilüsyon e; 10^{-5} dilüsyon f; 10^{-6} dilüsyon)

4.2. Patojenite Testi Çalışma Sonuçları

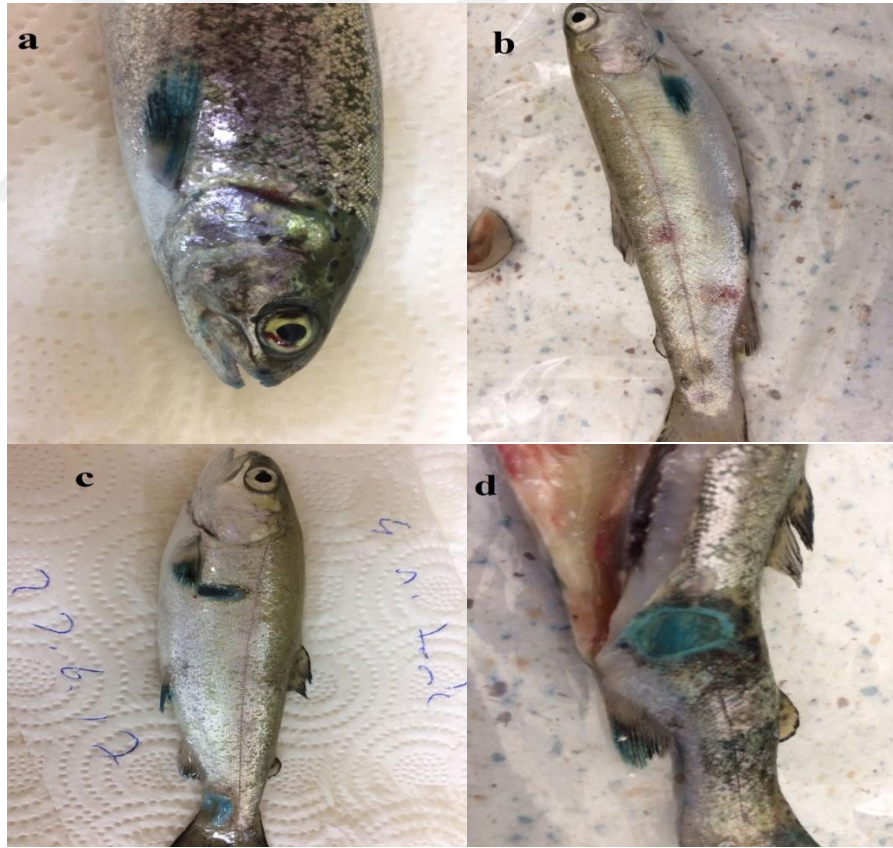
İlk balık ölümü virus verildikten 3 gün sonra kontrol grubu balıklarda gözlemlendi. rRT PCR testi sonucunda VHSV nükleik asiti tespit edilmeyen ölüm enfeksiyona bağlı olmayan ölüm olarak kaydedildi. Epruvasyonu takiben yapılan gözlemlerde mortalite oranları, kontrol grubunda %3,33, Bolu/06 dar plak izolat grubunda % 43,3, Bolu/06 geniş plak izolat grubunda %20, TR-WS13G dar plak izolat grubunda %33,3, TR-

WS13G geniş plak izolat grubunda %14,8 olarak tespit edildi. Hasta balıklar üzerinde yapılan gözlem ve ölen balıklarda yapılan nekropsi bulgularında ise deri renginde koyulaşma, anemi, ekzoftalmi, ülserasyon, solungaçlarda belirgin soluklaşma, göz etrafı, kuyruk ve gövde üzerinde erezyon ve epidermal kanama odakları gözlemlendi.

Tablo 5. Tanklardaki mortalite oranları

Kontrol Tankı	Bolu/06 Dar Plak Oluşturan Saf İzolat	Bolu/06 Geniş Plak Oluşturan Saf İzolat	TR-WS13G DarPlak Oluşturan Saf İzolat	TR-WS13G Geniş Plak Oluşturan Saf İzolat
1/30 (%3,33)*	13/30 (%43,3)	6/30 (%20)	9/27** (%33,3)	4/27** (%14,81)

* Virus tespit edilmedi. **Toplam 150 balık getirildi. Ön dinlendirmede 6 tanesi öldüğü için son iki grupta 27 balık kullanıldı

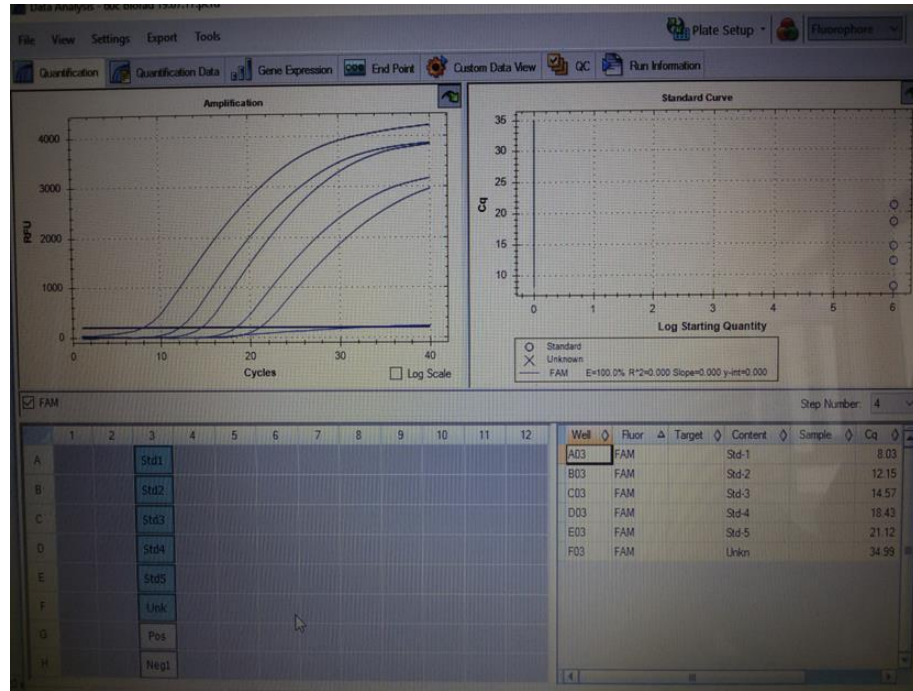
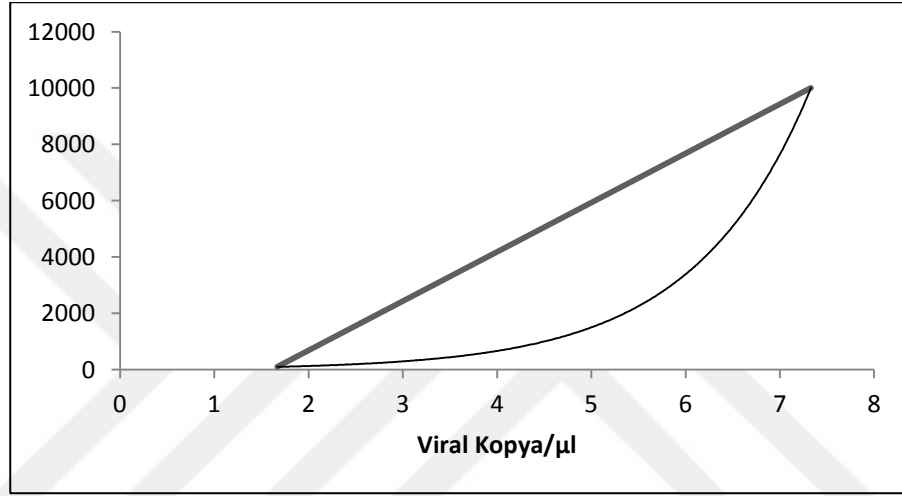


Şekil 14.a; gözde hemoraji, **b;** vücut yüzeyinde hemoraji, **c;** kuyruқта erezyon, **d;** yüzgeç bölgesinde erezyon

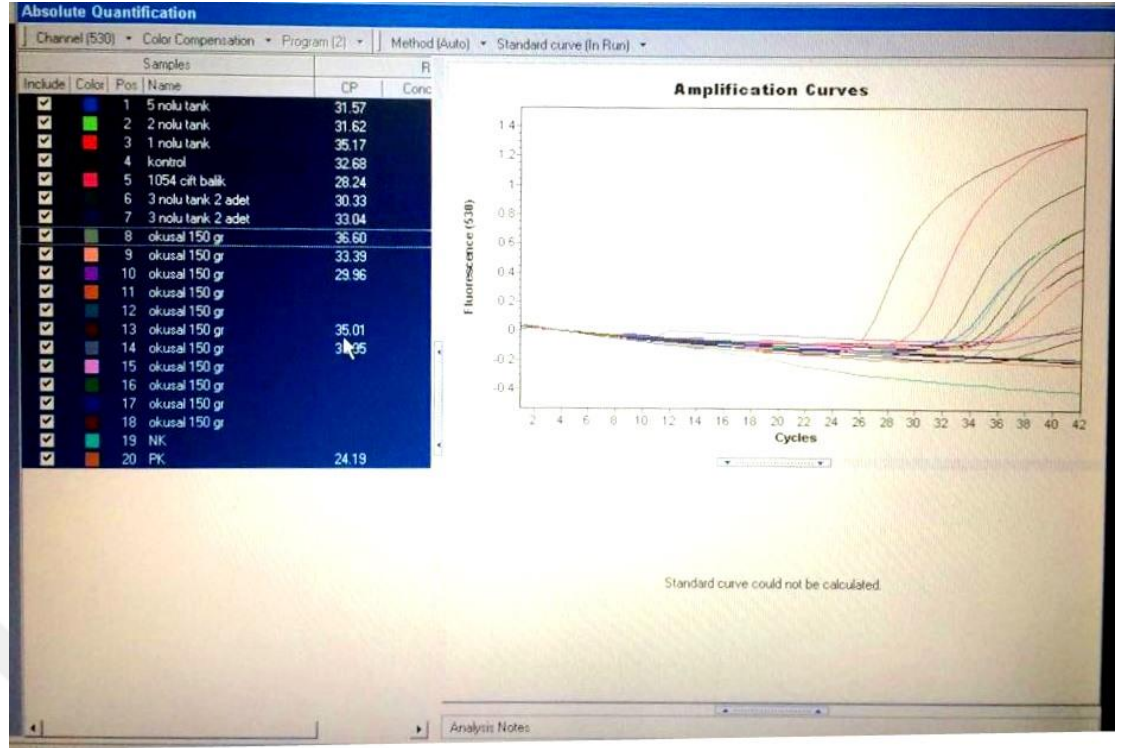
4.3. Moleküler Çalışma Sonuçları

rRT PCR sonuçlarına göre; deneme gruplarında ölen veya öldürülen tüm balıkların organ homojenizatlarından elde edilen ekstraktların tamamında VHSV RNA'sı tespit edildi. Test sonucunda ölen balık örneklerinde $7,33 \times 10^4$ - $1,67 \times 10^2/\mu\text{l}$ arasında viral kopya sayısı tespit edildi. Balık organ örneklerinde en yoğun C_T değeri 28,35 olarak kaydedildi.

Tablo 6. Balık örneklerindeki viral kopya sayısı



Şekil 15. Pozitif kontrol plazmidlerle elde edilen ışıma eğrileri



Şekil 16. Balık örneklerinden elde edilen RNA'ların oluşturduğu ışımaya eğrileri

5. TARTIŞMA

Burke ve Mulcahy'nin (1980) yaptığı IHNV plak çalışmasında çeşitli kaplama materyalleri değerlendirilmiştir. Agarozun, metilselüloz kaplamaya göre daha büyük plaklar oluşturduğu gözlemlenmiş fakat oluşan plak sayısı bakımından belirgin bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir (Burke ve Mulcahy, 1980). Çalışmamızda yaptığımız plak testinde VHS virus izolatları için kaplama materyali olarak kullanılan agarozun belirgin plaklar oluşturduğunu ve virusun Bolu/06 izolatında titrenin arttığı (Bolu/06 dar plak 10^6 /0,1 ml, Bolu/06 geniş plak 10^5 /0,1 ml), TR-SW13/G izolatında ise titrenin azaldığı (TR-SW13/G geniş plak 10^7 /0,1 ml, TR-SW13/G dar plak $10^{5.5}$ /0,1 ml) tespit edilmiştir.

Ülkemizde ilk olarak 2004 yılında kültüre alınan kalkan balıklarında, Immunoperoksidaz test (IPT), Immunofluorescent antikor test (IFA) ve ELISA yöntemleri kullanılarak teşhis edilmiştir (Kalaycı ve ark., 2006). 2005 yılında ise yine kültür kalkanlarında virusun ilk izolasyonu yapılmıştır. Bulunan virusun tamamı genotip Ie ile ilişkilendirilmiştir. Gürcistan'da bulunan GE-1.2 izolatı ile yakın ilişkide olduğu tespit edilmiştir (Nishizawa ve ark., 2006). 2007-2009 yılları arasında yapılan bir çalışmada toplamda 5967 adet çeşitli balık türleri VHSV yönünden incelenmiş ve 5 numunenin pozitif reaksiyon verdiği tespit edilmiştir. Pozitif numunelerin tümü kalkan balığından izole edilmiştir. Yapılan filogenetik çalışmada, izolatların tamamının genogrup Ie'ye ait olduğu saptanmıştır (Isıdan ve Bolat, 2011).

2015 yılında yayınlanan çalışmada Doğu Karadeniz doğal balık türleri üzerinde VHSV prevalansı incelenmiş ve karadeniz alabalığı'nın (%34 mortalite) en duyarlı tür olduğu tespit edilmiştir. Levrek %25, çipura %15, gökkuşacağı alabalığı ve kaynak alabalıkları %12 mortalite göstermiştir. İzole edilen virusun tamamı VHSV genotip-Ie'ye ait olduğu tespit edilmiştir (Altuntas, 2015).

Mevcut çalışmada ilk balık ölümü virusun intraperitoneal inokulasyonunu takiben 3 gün sonra kontrol grubunda meydana gelmiştir. Yapılan rRT PCR analizinde virus RNA'sı tespit edilmemiştir. Çalışmamızda deneysel enfeksiyon sırasında balıklarda deri renginde koyulaşma, anemi, ekzoftalmi, ülserasyon, solungaçlarda belirgin soluklaşma, göz etrafı, kuyruk ve gövde üzerinde erezyon ve epidermal kanama odakları gözlemlendi. Mortalite oranı ise toplamda % 22,9 olarak belirlenmiştir. Deneysel enfeksiyonun 15-17. günlerinden itibaren ölen balıklarda external

semptomların şiddetlendiği gözlenmiştir. Özellikle Bolu\06 izolatının verildiği balıklarda kuyrukta ve yüzgeçlerde şiddetli erezyon, göz etrafında kanamalar gözlenmiştir. Bulgular, gökkuşağı alabalıklarında Bolu\06 ile yapılan deneysel enfeksiyonlardaki semptomlarla tutarlılık göstermektedir.

Işidan ve ark. (2014) yaptığı çalışmada VHSV genotip Ie suşlarının çupra ve levrek balıklarında virulansını belirlemek amacıyla enfeksiyon denemesi yapılmıştır. TR-SW13/G izolatı ile çupraya yapılan enjeksiyon ve daldırma yöntemleriyle toplamda 10 balığın öldüğü tespit edilmiştir. TB13/H15 izolatıyla yapılan denemede ise sadece daldırma yöntemiyle yapılan denemede 1 balığın öldüğü tespit edilmiştir. Levrek denemelerinde ise TR-SW13/G izolatı verilen balıklarda enjeksiyon yöntemiyle yapılan denemede 2 balık ölümü gözlenmiş, TB13/H15 izolatı verilen balıklarda ise enjeksiyon denemesinde 3, daldırma denemesinde 1 balığın öldüğü tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bağlı olarak bu balıkların duyarlılıklarının düşük olduğu ortaya konmuştur (Işidan ve Kutlu, 2014).

Yaptığımız çalışmada ise TR-SW13/G izolatı verilen 54 balıktan 13 tanesinin öldüğü, mortalite oranının ise % 24,07 olduğu tespit edilmiştir. Bolu\06 izolatı verilen 60 balıktan 19 tanesinin öldüğü ve mortalite oranının % 31,6 olduğu belirlenmiştir. Dar plak çapına sahip her iki izolatında, geniş plak çapına sahip izolatlardan daha patojen olduğu ve mortalite oranları doğrultusunda gökkuşağı alabalıklarda Bolu\06 izolatının daha patojen olduğu sonucuna ulaşılabilir.

Serolojik olarak ilk antikor yanıtı enfeksiyondan 3-4 hafta sonra tespit edilebilir. Antikor düzeyi akut enfeksiyon sonrası altı ay boyunca yüksektir (Schyth ve ark,2012). Epidemiyolojik araştırmalar sırasında yeni izolatların genotipini hızlı bir şekilde belirlemek, izolatın virulansı hakkında tahmin yapmayı kolaylaştırır. Son zamanlarda VHSV'yi nicel (viral yük) olarak tespitini sağlamak ve virusun genotipini belirlemek amacıyla Nükleoprotein (N) geninin korunmuş bir bölgesini hedef alan ve virusun tüm Avrupa izolatlarını saptayabilen rRT PCR geliştirilmiştir. N geni viral replikasyon sırasında G geninden daha fazla olduğu bilinmektedir. Ayrıca N geni rRT PCR'ı VHSV'nin G genini hedefleyen denemelerden daha iyi sonuç alındığı ve daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (Matejusova ve ark., 2008). Testte, hedef sekansı içeren in vitro RNA transkripti olan bir plazmit pozitif kontrol olarak kullanılabilir (Purcell ve ark., 2006; Matejusova ve ark., 2008; Cutrín ve ark., 2009; Calleja ve ark., 2012;

Blanda ve ark., 2013; Kim ve ark., 2014). Çalışmamızda G genine özgül primerler ve prob kullanıldı. Pozitif kontrol olarak ise virusun tüm G genini içeren plazmid kullanıldı.

C_T (Cycle threshold) seviyeleri, numunedeki hedef nükleik asit miktarıyla ters orantılıdır. C_T seviyesinin düşük olması, numunedeki hedef nükleik asidin miktarını artırır. C_T 'in 29'dan küçük olması ise numunedeki bol miktarda hedef nükleik asidi gösteren kuvvetli pozitif reaksiyonlar olarak kaydedilir. Çalışmamızda C_T değerinin en yoğun 28,35 olarak kaydedilmiş ve her numunede VHSV RNA'sı bulunmuştur. Bu bulgular N genine özgü geliştirilen rRT PCR ile paralellik göstermektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Su ürünleri tüketimi son yıllarda alternatif gıda maddesi olarak kullanımı yaygın hale gelmektedir. Tüketim miktarındaki artışa bağlı olarak su ürünleri yetiştiriciliği hız kazanmaktadır. 2015 yılı verilerine göre dünyada avcılık yoluyla elde edilen balık 93.704.616 ton iken, yetiştiricilik ile elde edilen balık 76.641.025 tondur. Ülkemizde ise 2016 Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre avcılık yoluyla elde edilen balık 335.320 ton iken yetiştiricilik ile elde edilen balık 253.395 tondur. Ülkemizde alabalık yetiştiriciliği 2000 yılında 44.533 ton üretim kaydedilirken, 2016 verilerine göre toplam 107.013 ton üretimi vardır (TÜİK, 2016).

Üretimin artış göstermesi, hastalık riskini beraberinde getirmiştir. Özellikle viral kökenli enfeksiyonların yol açtığı epidemik salgınlar balıklar için büyük risk oluşturmaktadır. Ülkemizde 82/894/EEC sayılı Avrupa Birliği Konsey Direktifi ile 2005/176/EC sayılı Avrupa Birliği Komisyon Kararına paralel olarak VHS ihbari mecburi hastalık olarak kabul edilmiştir (GTHB, 2011).

Yaptığımız çalışmada VHS virusunun kalkan balığından izole edilen TRSW13 izolatının, alabalıklardan izole edilen Bolu\06 izolatına göre gökkuşacağı alabalıklarında daha düşük mortalite gösterdiği ortaya konmuştur. Her iki izolatın dar plak oluşturan saflaştırılmış virusların, geniş plak oluşturanlara göre daha patojen olduğu tespit edilmiştir. Tüm balıkların organlarından oluşturulan homojenatta VHSV RNA'sı bulunması, virusun her iki izolatının da gökkuşacağı alabalıklarında patojenitesinin yüksek olduğunu kanıtlamıştır.

Karadeniz bölgesinde yapılan çalışmaların tamamında numunelerde bulunan VHSV'nin genotip Ie grubuna ait olduğunu görmekteyiz. Buna bağlı olarak bölgesel VHSV izolatlarının patojenite özelliklerini daha ayrıntılı incelenmesi için yeni araştırmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahmadivanda S, Soltania M, Mardanib K, Shokrpooor S, Holasooa HR, Mokhtaria A,Hasanzadeh R. Isolation and identification of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. *Acta Tropica* 2016;156: 30–36.
- Altuntas C, Oğut H. Monthly occurrence and prevalence of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) in whiting *Merlangius merlangus*. *Dis Aquat Organ* 2010; 88: 107-113.
- Altuntas C. Viral hemorajik sepsisemi virusü'nün (VHSV) Doğu Karadeniz'de yaşayan doğal balık türlerinde yayılımı, epidemiyolojisi ve kültür balıkları üzerine virülensi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Doktora Tezi, 2015.
- Alvarez-Torres D, Podadera MA, Bejar J, Bandin I, Alonso MC ve Garcia-Rosado E. Role of the IFN I system against the VHSV infection in juvenile senegalese sole (*Solea senegalensis*) *Vet Res* 2016; 47: 3.
- Ammayappan A, Vakharia VN. Nonvirion protein of novirhabdovirus suppresses apoptosis at the early stage of virus infection. *J Virol* 2011; 85: 8393–8402.
- Biacchesi S. The reverse genetics applied to fish RNA viruses. *Vet Res.* 2011; 42(1): 12.
- Blanda F, Snow M, Garvercka, Matejusova I. Genotype-specific Taqman® assays for the detection and rapid characterisation of European strains of viral haemorrhagic septicaemia virus. *J Virol Methods* 2013; 187: 209–214.
- Bowen RA. Fenner's veterinary virology. 4rd Ed, San Diego, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2011; 327-341.
- Burke JA, Mulcahy D. Plaque procedure for infectious hematopoietic necrosis virus. *J Appl Environ Microbiol* 1980;4: 872-876.
- Calleja F, Godoy MG, Cárcamo JG, Bandín I, Yáñez AJ, Dopazo CP, Kibenge FS, Avendano-Herrera R. Use of reverse transcription-real time polymerase chain reaction (real time RT-PCR) assays with universal probe library (upl) probes for the detection and genotyping of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated in Chile. *J Virol Methods* 2012; 183: 80–85.
- Campbell S, Mcbeath A, Secombes C, Snow M, Collet B. Interferon response following infection with genetically similar isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) exhibiting contrasting virulence in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol* 2011;30: 287-294.

- Canoa I, Colletb B, Pereira C, Paleya R, Aerlea R, Stonea D, Taylora NGH. In vivovirulence of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) correlates inversely with in vitro Mx gene expression. *Vet Microbiol* 2016; 187: 31–40.
- Chilmonczyk S, Monge VD. Pathogenesis of viral haemorrhagic septicaemia virus: cellular aspects. *Vet Res* 1995; 26: 505-511.
- Cutrín JM, Olveira JG, Bandín I, Dopazo CP. Validation of real time RT-PCR applied to cell culture for diagnosis of any known genotype of viral haemorrhagic septicaemia virus. *J Virol Methods* 2009; 162: 155–162.
- Dobos P. Use of gum tragacanth overlay, applied at room temperature, in the plaque assay of fish and other animal viruses. *J Clin Microbiol* 1976; 3: 373-375.
- Einer-Jensen K, Ahrens P, Forsberg R, Lorenzen N. Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J Gen Virol* 2004; 85: 1167–1179.
- Einer-Jensen K, Harmache A, Biacchesi S, Bremont M, Stegmann A, Lorenzen N. High virulence differences among phylogenetically distinct isolates of the fish rhabdovirus viral hemorrhagic septicaemia virus are not explained by variability of the surface glycoprotein G or the nonvirion protein Nv. *J Gen Virol* 2014; 95: 307–316.
- Escobar-Herrera J, Medina-Ramírez FJ, Gutiérrez-Escolano AL. A carboxymethyl cellulose plaque assay for feline calicivirus. *J Virol Methods* 2007; 146: 393-396.
- Gadd T. Fish rhabdoviruses; viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) and perch rhabdovirus (PRV): study of viral strains and the disease epidemiology in Finland. University of Helsinki, Faculty Of Veterinary Medicine, Finland, PhD Thesis, 2013; 18-38.
- GTHB, 2011. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/01/20110122-4.htm>.
- He M, YanXC, LiangY, SunXW, Teng CB. Evolution of the viral hemorrhagic septicemia virus: divergence, selection and origin. *Mol Phylogenet Evol* 2014; 4: 1–7.
- Herzog P, Drosten C, Müller MA. Plaque assay for human coronavirus NL63 using human colon carcinoma cells. *Virol J* 2008; 5: 138.
- Isıdan H, Bolat Y. A survey of viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Turkey. *Turk J Fish Aquat Sci* 2011; 11: 507-513.
- Isıdan H, Kutlu İ. Viral hemorajik septicemi virus genotip 1e suşlarının çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) balıkları üzerinde patojenitelerinin belirlenmesi. *Yunus Araştırma Bülteni* 2014; 2: 49-53.

- Isshiki T, Nishizawa T, Kobayashi T, Nagano T, Miyazaki T. An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis Aquat Org* 2001; 47: 87–99.
- Kalaycı G, Incoğlu S, Ozkan B. 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* 2006; 26: 157-162.
- Kalaycı G, İncöğlü Ş, Ozyer BÖ, Küçükali Y. Türkiye’de infeksiyöz pankreatik nekrozis ve viral hemorajik sepsis hastalıklarının durumu. *Bornova Vet Bil Derg* 2012; 34 (48): 31-38.
- Kim MS, Kim KH. The role of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) NV gene in TNF- α and VHSV infection-mediated NF- κ B activation. *Fish Shellfish Immunol* 2013; 34: 1315-1319.
- Kim MS, Choi SH, Kim KH. Effect of G gene-deleted recombinant viral hemorrhagic septicemia virus (rVHSV- Δ G) on the replication of wild type VHSV in a fish cell line and in olive flounder (*Paralichthys Olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol* 2016; 54: 598-601.
- Kim MS, Choi SH, Kim KH. Over-passage of epithelioma papulosum cyprini (EPC) cells increased viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) replication. *Fish Shellfish Immunol* 2016; 58: 318-322.
- Kim R, Faisal M. Emergence and resurgence of the viral hemorrhagic septicemia virus (*Novirhabdovirus*, *Rhabdoviridae*, *Mononegavirales*). *J Adv Vet Anim Res* 2011; 2: 9–23.
- Kim JO, Kim WS, Kim SW, Han HJ, Kim JW, Park MA, Oh MJ. Development and application of quantitative detection method for viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) genogroup IVa. *Viruses* 2014; 6: 2204-2213.
- Kinkelin P, Berre LM. Isolement d'un rhabdovirus pathogène de la truite fario (*Salmotrutta*, L.). *C r Acad Sci Paris, Serie D* 1977; 284: 101-104.
- Lyngstada TM, Hellberga H, Viljugreina H, Jensena BB, Bruna E, Sergeantb E, Tavoranpanich S. Routine clinical inspections in Norwegian marine salmonid sites: a key role in surveillance for freedom from pathogenic viral haemorrhagic septicemia (VHS). *Prev Vet Med* 2016; 124: 85–95.
- Matejusova I, McKay P, McBeath AJA, Collet B, Snow M. Development of a sensitive and controlled real-time RT-PCR assay for viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) in marine salmonid aquaculture. *Dis Aquat Organ* 2008; 80: 137–144.
- Matrosovich M, Matrosovich T, Garten W, Klenk HD. New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virol J* 2006; 3: 63.

- McAllistera J, Gaucia PJ, Mitchell IR, Boyle DB, Bulach DM, Weir RP, Melville LF, Davis SS, Gubala AJ. Genomic characterisation of almpiwar virus, harrison dam virus and walkabout creek virus; threenovel rhabdoviruses from northern Australia. *Virol Rep* 2014; 3–4: 1-17.
- Najib A, Kim MS, Choi SH, Kang YJ, Kim KH. Changes in micrnas expressionprofile of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in response to viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection. *Fish Shellfish Immunol* 2016; 51: 384-391.
- Nishizawa T, Savas, H, Isıdan H, Ustündağ C, Iwamoto H, Yoshimizu M. 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* 2006; 72: 2373–2378.
- OIE 2017. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/c_hapitre_vhs.pf 2017.
- Olesen NJ. Sanitation of viral haemorrhagic septicaemia (VHS). *J Appl Ichthyol* 1998; 14: 173–177.
- Pham PH, Lumsden JS, Tafalla C, Dixon B, Bols NC. Differential effects of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotypes IVa and IVb on gill epithelial and spleen macrophage cell lines from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 2013; 34: 632-640.
- Purcell MK, Hart SA, Kurath G, Winton JR. Strand-specific, real-time RT-PCR assays for quantification of genomic and positive-sense RNAs of the fish rhabdovirus, infectious hematopoietic necrosis virus. *J Virol Methods* 2006; 132: 18–24.
- Purcell MK, Laing KJ, James R, Winton. Immunity to fish rhabdoviruses. *Viruses* 2012; 4: 140-166.
- Quillet E, Dorson M, Aubard G, Torhy C. In vitro viral haemorrhagic septicaemia virus replication in excised fins of rainbow trout: correlation with resistance to waterborne challenge and genetic variation. *Dis Aquat Organ* 2001; 45: 171–182.
- Schönherz AA, Lorenzen N, Einer-Jensen K. Inter-species transmission of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from turbot (*Scophthalmus maximus*) to rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *J Gen Virol* 2013; 94: 869–875.
- Schütze H, Mundt E, Mettenleiter TC. Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus Genes* 1999; 19: 59–65.

Schyth BD, Ariel E, Korsholm H, Olesen NJ. Diagnostic capacity for viralhaemorrhagic septicaemia virus (VHSV) infection rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is greatly increased by combining viralisolation with specific antibody detection. Fish Shellfish Immunol 2012; 32(4): 593-597.

Skall HF, Slierendrecht WJ, King JA, Olesen NJ. Experimental infection of rainbowtrout *Oncorhynchus mykiss*with viral haemorrhagic septicaemia virus isolatesfrom European marine and farmed fishes. Dis Aquat Organ 2004; 58: 99–110.

Skall HF, Olesen NJ ve Mellergaard S. Viral haemorrhagic septicaemia virus in marinefish and its implications for fish farming. J Fish Dis 2005; 28: 509–529.

Thoulouze MI, Bouguyon E, Carpentier C, Bre'Mont M. Essential role of the NVprotein of novirhabdovirus for pathogenicity in rainbow trout. J Virol 2004; 4: 4098–4107.

TÜİK 2016. <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=24657>.



T.C.
GIDA TARIM VE HAYVANCILIK
BAKANLIĞI

Tarih/Sayı:29.07.2016/7-1
Karar No : 7-1

T.C.
GIDA TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI
Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürüğü
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



ETİK KURUL RAPORU

Kurulumuza 25/07/2016 tarihinde başvurusu yapılan Doç. Dr. Harun Albayrak' ın yürütücüsü bulunduğu «Viral Hemorajik Septisemi Virusunun (VHSV) Fenotipik Karakterinin Virulans Üzerine Etkisinin Araştırılması» konusundaki araştırma projesi kurulun 29/07/2016 tarihli oturumunda değerlendirilmiştir.

Karar: Projenin yürütülmesi uygun görülmüştür.

Üye
Meh UZUN

Üye
Yüksel DURMAZ
(Katılmadı)

Üye
Yunus GÜBÜR

Üye
Remzi YURTSEVEN

Başkan
Dr. Nesilhan ORMANCI

Üye
Gülnur SAĞLAM

Üye
Gülnur SERDAR
(Katılmadı)

Üye
Faruk ÇÖPÖÇÜ

Üye
Adem ÖZTÜRK

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Yasemin ÇİÇEK

Doğum Yeri: Arsin/ TRABZON

Doğum Tarihi: 20.10.1984

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Ankara Üniversitesi - 2007

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Elazığ Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü
Müdürlüğü\ELAZIĞ 2011-2014;

Uluslararası Hayvancılık Araştırma Ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü\ANKARA-
2014

E-posta: cicekyasemin@gmail.com