



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ
HASTALIKLARI ANABİLİM
DALI



ALABALIKLARDA İNFEKSİYÖZ PANKREATİK NEKROZ VİRÜSÜ
(IPNV), İNFEKSİYÖZ HEMATOPOİETİK NEKROZ VİRÜSÜ (IHNV),
VİRAL HEMORAJİK SEPTİSEMİ VİRÜSÜ (VHSV) VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI VE IPNV İZOLATLARININ VP2 VE VP5 GEN
BÖLGELERİNDEKİ VARYASYONLARINA GÖRE
VİRÜLENSLERİNİN İNCELENMESİ

AYŞE GÜL BÜYÜKEKİZ

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2017



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI



**ALABALIKLARDA İNFEKSİYÖZ PANKREATİK NEKROZ
VİRÜSÜ (IPNV), İNFEKSİYÖZ HEMATOPOİETİK NEKROZ
VİRÜSÜ (IHNV), VİRAL HEMORAJİK SEPTİSEMİ VİRÜSÜ
(VHSV) VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE IPNV
İZOLATLARININ VP2 VE VP5 GEN BÖLGELERİNDEKİ
VARYASYONLARINA GÖRE VİRÜLENSLERİNİN
İNCELENMESİ**

AYŞE GÜL BÜYÜKEKİZ

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof. Dr. Soner ALTUN

TÜBİTAK 2214/A 1059B141500122

BURSA-2017

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum “Alabalıklarda İnfeksiyöz Pankreatik Nekroz Virüsü (IPNV), İnfeksiyöz Hematopoietik Nekroz Virüsü (IHNV), Viral Hemorajik Septisemi Virüsü (VHSV) Varlığının Araştırılması ve IPNV İzolatlarının VP2 ve VP5 Gen Bölgelerindeki Varyasyonlarına Göre Virülenslerinin İncelenmesi” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.








**Ayşe Gül
BÜYÜKEKİZ
20.07.2017**

KABUL ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Ayşe Gül BÜYÜKEKİZ tarafından hazırlanan "Alabalıklarda İnfeksiyöz Pankreatik Nekroz Virüsü (IPNV), İnfeksiyöz Hematopoietik Nekroz Virüsü (IHNV), Viral Hemorajik Septisemi Virüsü (VHSV) Varlığının Araştırılması ve IPNV İzolatlarının VP2 Ve VP5 Gen Bölgelerindeki Varyasyonlarına Göre Virülenslerinin İncelenmesi" konulu Doktora tezi 11/08/2017 günü, 10.00-11.00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Sovadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Soner ALTUN	
Üye	Prof. Dr. Süheyla KARATAŞ STEINUM	
Üye	Prof. Dr. Mustafa HASÖKSÜZ	
Üye	Doç. Dr. Musa Özgür ÖZYİĞİT	
Üye	Doç. Dr. Esra KOCAKAYA BÜYÜKCANGAZ	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

20/07/2017

Adı Soyadı: Ayşe Gül BÜYÜKEKİZ

Anabilim Dalı: Su Ürünleri Hastalıkları

Tez Konusu: Alabalıklarda İnfeksiyöz Pankreatik Nekroz Virüsü (IPNV), İnfeksiyöz Hematopoitik Nekroz Virüsü (IHNV), Viral Hemorajik Septisemi Virüsü (VHSV) Varlığının Araştırılması ve IPNV İzolatlarının VP2 Ve VP5 Gen Bölgelerindeki Varyasyonlarına Göre Virülenslerinin İncelenmesi

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

ANABİLİM DALI ONAYI

Ünvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Soner ALTUN

İmza:



İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI	III
KABUL ONAY	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis	3
2.1.1 Tarihçesi	3
2.1.2 Hastalığın Etiyolojisi.....	4
2.1.2.1 Taksonomisi	4
2.1.2.2 Genomu	4
2.1.3 Genogrupları ve Serotipleri.....	6
2.1.4 Replikasyonu	8
2.1.5 Virülens Faktörleri	8
2.1.5.1 VP2 Gen Bölgesi.....	9
2.1.5.2 VP5 Gen Bölgesi.....	10
2.1.6 Epizootiyolojisi	11
2.1.7 Klinik Belirtileri	13
2.1.8 Patogenezi	14
2.1.9 Patolojisi.....	14
2.1.10 Teşhisi	15
2.1.11 İmmunitesi	16
2.1.12 Kontrolü	17
2.1.13 Aşılması.....	18
2.2 Viral Hemorajik Septisemi.....	19
2.2.1 Tarihçesi	19
2.2.2 Etiyolojisi	20

2.2.3	Epidemiyolojisi	22
2.2.4	Klinik Belirtileri	25
2.2.5	Patolojisi.....	27
2.2.6	Patogenezi	28
2.2.7	Teşhisi	28
2.2.8	Kontrolü ve Tedavisi.....	29
2.3	İnfeksiyöz Hematopoitik Nekrozis.....	30
2.3.1	Tarihçesi.....	30
2.3.2	Etiyolojisi	31
2.3.3	Epizootiyolojisi	32
2.3.4	Klinik Belirtileri	33
2.3.5	Teşhisi	34
2.3.6	Koruma ve Kontrolü	35
2.3.7	Aşılması.....	36
3	GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1	Gereç	37
3.1.1	Örnekleme	37
3.2	Yöntem.....	39
3.2.1	Balık Örneklerinin Hazırlanması	39
3.2.2	Hücre Kültürü.....	40
3.2.3	Virüslerin İzolasyonu	41
3.2.4	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	42
3.2.5	Nötralizasyon Testi	42
3.2.6	Süpernatantlardan RNA Ekstraksiyonu ve İzolasyonu	43
3.2.7	Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	43
3.2.8	Jel Elektroforez	44
3.2.9	Dokulardan RNA Ekstraksiyonu ve İzolasyonu	45
3.2.10	Eş Zamanlı Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)	45
3.2.11	cDNA Hazırlanması	46
3.2.12	VP2 ve VP5 Gen Bölgeleri İçin Primer Dizaynı	46
3.2.13	VP2 ve VP5 Gen Bölgelerinin Çoğaltılması.....	47
3.2.14	DNA Ürünlerinin Jelden Pürifiye Edilmesi	48
3.2.15	VP2 ve VP5 Gen Bölgelerinin Klonlanması.....	48
3.2.16	Plasmid DNA Pürifikasyonu.....	49
3.2.17	Filogenetik Analiz	50

3.2.18 TCID ₅₀ (Doku Kültürü Enfektif Dozu) Hesaplanması.....	50
3.2.19 Hücresel İmmun Yanıtın Ölçülmesi.....	51
3.2.20 Eş Zamanlı Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)	51
4 BULGULAR	53
4.1 Örnekleme	53
4.2 Hücre Kültüründe Virüs İzolasyonu ve ELISA Testi	53
4.3 Nötralizasyon Testi	56
4.4 RNA İzolasyonu ve Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	56
4.5 Eş Zamanlı Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) ..	57
4.6 VP2 ve VP5 Gen Bölgelerinin Çoğaltılması.....	58
4.7 DNA Ürünlerinin Jelden Pürifiye Edilmesi	58
4.8 VP2 ve VP5 Gen Bölgelerinin Klonlanması.....	59
4.9 Filogenetik Analiz.....	59
4.9.1 VP2.....	60
4.9.2 VP5.....	62
4.10 Sekans Analizi.....	64
4.10.1 VP2.....	64
4.10.2 VP5.....	68
4.11 TCID ₅₀ Hesaplanması	71
4.12 Hücresel İmmun Yanıt Ölçüm Sonuçları.....	73
5 TARTIŞMA VE SONUÇ	76
5.1 Tartışma.....	76
5.2 Sonuç.....	81
6 KAYNAKLAR	82
7 SİMGELER VE KISALTMALAR	99
8 TEŞEKKÜR	102
9 ÖZGEÇMİŞ	103

ÖZET

Türkiye'de gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmelerinde İnkefsiyöz Pankreatik Nekroz Virüsü (IPNV) yaygın iken Viral Hemorajik Septisemi Virüsü (VHSV) 2006'da tespit edilmiş ancak İnkefsiyöz Hematopoitik Nekroz Virüsü (IHNV) varlığı bildirilmemiştir. Bu çalışmada Türkiye'nin 6 farklı bölgesinde IPNV, VHSV, IHNV varlığı ve IPNV izolatlarının VP2 ve VP5 gen bölgelerinin filogenetik gruplandırması yapılarak virülensleri incelenmiştir. Virüs izolasyonu BF-2 ve EPC hücre kültürleri kullanılarak, identifikasyonu ise ELISA (Enzyme Linked Immuno Assay) ve RT-PCR (Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile yapılmıştır. IPNV suşlarının genogrupları ve virülens motiflerini belirlemek için dizi analizi yapılmıştır. IPNV suşlarının immun gen uyarımlarının belirlenmesi amacıyla ise TO (Atlantik somon ön böbrek hücre hattı) hücre kültürü kullanılmış ve bu hücre kültüründeki IFN, Mx ve Viperin gen miktarları RT-qPCR (Eş Zamanlı Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile ölçülmüştür. Çalışmada VHSV ve IHNV tespit edilemezken IPNV'nin tüm bölgelerde yaygın ve prevalansının %27,14 olduğu saptanmıştır. VP2 gen bölgesinin sekans ve filogenetik analiz sonuçları Türkiye'den izole edilen IPNV suşlarının genogrup 5'te (serotip Sp-A2) yer aldığını ve amino asit dizilimine göre tüm suşların P₂₁₇T₂₂₁ motifini barındırdığını göstermiştir. VP5 gen bölgesi nükleotit ve amino asit dizi analiz sonuçları suşların birbirlerine %97-100 benzer olduğunu ortaya koymuştur. VP2 ve VP5 gen bölgelerinin filogenetik analiz sonuçları ile suşların coğrafi kökenleri arasında herhangi bir ilişki saptanamamıştır. Hücre kültüründe yapılan immun yanıt çalışmalarında suşların IFN, Mx ve Viperin genlerini uyardığı tespit edilirken suşlar arasında immun yanıt uyarımlarının anlamlı sonuçlar vermediği tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: IPNV, VHSV, IHNV, VP2, VP5, virülens

ABSTRACT

Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Turkey is prevalent while in VHSV (Viral Hemorrhagic Septicemia Virus) has been reported in 2006, but IHNV (Infectious Hematopoietic Necrosis Virus) are detected yet. In this study, presence of IPNV, VHSV, IHNV and phylogenetic analysis of VP2 and VP5 genes and virulence of IPNV in six different regions of Turkey were examined. Virus isolation was performed using BF-2 and EPC cell cultures, and identification was performed by ELISA and RT-PCR. Sequence analysis was performed to determine the genogroups and virulence motifs of IPNV strains. TO cell culture was used in order to determine the induction of immune genes and IFN, Mx and Viperin genes was measured by RT-qPCR. In all of Prevalance of IPNV was found 27.14% while VHSV and IHNV were not detected. IPNV VP2 gene region was sequenced for analysis of phylogenetic examination and IPNV strains of were belonged to genogroup 5 (serotype Sp-A2) and the amino acid sequence showed all strains had P₂₁₇T₂₂₁ amino acid motif. The VP5 gene region nucleotide and amino acid sequence analysis results showed that the strains were 97-100% similar to each other. The phylogenetic analysis results of VP2 and VP5 gene regions did not reveal any relationship between the strains and their geographical origins. However IFN, Mx and Viperin immune genes were induced by IPNV stains, there were no significant results.

Key words: IPNV, VHSV, IHNV, VP2, VP5, virulence

1 GİRİŞ

Tüm dünyada su ürünleri üretimi ortalama her yıl %10'dan fazla büyüme göstererek gelişimini sürdürmektedir (Reinertsen ve Haaland, 1995). Ülkemizde ise 1980 yılından bu yana kültür balıkçılığında başta gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) olmak üzere toplam balık üretiminde hızlı bir artış görülmüş ve günümüzde toplam gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) üretim miktarı iç sularda 101,166 ton/yıl, denizde ise 6872 ton/yıl'a ulaşmıştır (TÜİK, 2016). Su ürünleri yetiştiriciliğinin üretim artışını olumsuz yönde etkileyen faktörlerin başında hastalıklara bağlı sorunlar gelmektedir. Sürdürülebilir yetiştiricilik açısından balıkların uygun koşullarda yetiştirilmesi ve hastalıklardan korunması büyük önem taşımaktadır. Su ürünleri hastalıklarından kaynaklanan olumsuzlukları engellemek amacıyla Avrupa Birliği (AB) balık sağlığı kontrolü için gerekli yasal düzenlemeleri "AB Balık Sağlığı Rejimi" isim ve "91/67/EEC" sayılı yönetmelikle yürürlüğe koymuştur. Bu yönetmelik kapsamında balık hastalıklarından arındırılmış kuşaklar oluşturulması için öncelikle mevcut hastalıklardan korunma programlarının ve bu programların oluşturulması için gerekli verilerin elde edilmesi gerekmektedir.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde salgın hastalıklar büyük ekonomik kayıplara neden olabilmekte ve çoğu durumda, koruyucu ve tedavi edici önlemler alınamamaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde meydana gelen ekonomik kayıpların %30-50'si hastalıklardan kaynaklanmaktadır. Dünya Bankası 1997 yılında küresel olarak su hayvanları yetiştiriciliğinde oluşan hastalık kayıplarının tahmini ekonomik değerinin ~3 milyar ABD Doları olduğunu açıklamıştır (Tan ve ark. 2006).

Türkiye'de bugüne kadar hem kültür balıklarında hem de doğal balıklarda görülen viral hastalıklar konusunda yapılan çalışmalar sınırlıdır. Gökkuşağı alabalıklarında (*O. mykiss*) IPNV enfeksiyonları ile ilgili olarak Türkiye'de yapılan çalışmalar daha çok vaka bildirimini veya bölgesel nitelikte olup etkenlerin detaylı genomik çalışmaları yapılmamıştır (Değirenci ve ark., 2008; Kalaycı ve ark., 2012; Toplu ve ark., 2010). Viral hastalıklarla mücadelede hastalık etkeni virüslerin

genotipik karakterlerinin bilinmesi koruma ve kontrol stratejilerinin belirlenmesinde önemli bir unsurdur. Bu araştırmada;

- Ülkemizin 6 farklı bölgesindeki gökkuşığı alabalığı (*O. mykiss*) işletmelerinde IPNV, VHSV ve IHNV varlığının araştırılması,
- IPNV suşlarının VP2 gen bölgesine göre genotiplendirilmesi,
- IPNV suşlarının VP2 ve VP5 gen bölgelerindeki varyasyonlarına göre virülenslerinin belirlenmesi,
- IPNV suşlarının immun gen uyarımlarının ölçülmesi amaçlanmıştır.



2 GENEL BİLGİLER

2.1 İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis

2.1.1 Tarihçesi

İnfeksiyöz Pankreatik Nekroz (IPN) hastalığı ilk olarak Kanada'da 1940 yılında McGonigle tarafından, besin kesesini absorbe etmiş, yeme başlama dönemindeki yavru alabalıklarda bildirilmiştir (McGonigle, 1941). O dönemde beslenme hatalarına bağlı bir sendrom olduğu düşünülmesi nedeniyle Akut Kataral Enteritis olarak isimlendirilmiştir. Wood ve arkadaşları on dört yıl sonra akut kataral enteritisle seyreden olgunun infeksiyöz özellikte olduğunu ortaya koymuş ve hastalığa, pankreasta görülen lezyonlara dayanarak İnfeksiyöz Pankreatik Nekroz adını vermiştir (Wood ve ark., 1955). İnfeksiyöz Pankreatik Nekroz Virüsü (IPNV), hücre kültüründen izole edilen ilk balık virüsüdür.

IPNV ilk olarak Amerika'da 1957 yılında Wolf ve arkadaşları tarafından dere alasından (*Salvelinus fontinalis*) izole edilmiştir (Wolf ve ark., 1958). Bu prototip 1963 yılında Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'nda (ATCC) VR299 referans numarasıyla kayıt altına alınmıştır. Gökkuşacağı alabalıklarından (*O. mykiss*) ise ilk defa Parisot ve arkadaşları tarafından 1963 yılında izole edilmiştir (Parisot ve ark., 1963). Avrupa'da ilk IPN salgını 1964 yılında Güney Fransa'daki gökkuşacağı alabalıklarında (*O. mykiss*) görülmüştür. Danimarka'nın Spjarup kasabasında 1968 yılında gökkuşacağı alabalıklarından (*O. mykiss*) izole edilen virüs, Sp (Sjarup) serotipi olarak adlandırılmıştır (Jorgensen ve Bregnbal, 1969). Asya'da ilk IPNV izolasyonu Japonya'da 1971, Tayvan'da 1983 ve Yeni Zelanda'da 1987 yılında yapılmıştır (Duncan ve ark., 1991; Wolf, 1988).

Ülkemizde gökkuşacağı alabalığı (*O. mykiss*) yumurtalarının ithalatının 1990 yılından sonra hızla artmasıyla beraber yavru balıklarda tedavi edilemeyen ölümler görülmüştür. Hastalığın tipik belirtileri ve yüksek ölüm oranı IPN varlığına işaret

etmiştir. Ülkemizde Timur ve arkadaşları tarafından 1993 yılında yapılan elektron mikroskopi ve histopatoloji çalışmalarıyla IPN varlığı kanıtlamıştır (Timur ve ark., 1993). Buna rağmen Türkiye’de IPNV, ilk olarak 2002 yılında Candan tarafından gökkuşuğu alabalıklarında (*O. mykiss*) bildirilmiştir (Candan, 2002).

IPN hastalığı, Avrupa Birliği 91/67/EEC kararının *Annex A* bölümünde yer alan liste III içerisinde bulunmaktadır. IPN, 2006 yılı sonuna kadar Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü’nde (OIE) bildiri zorunlu hastalıklar listesinde yer alırken 2006 yılından sonra listelerden çıkarılmıştır (OIE, 2006). Ülkemizde ise 3285 sayılı Hayvan Sağlığı Zabıtası Kanunu’na göre yayımlanan İhbarı Mecburi Hastalıklar tebliğine göre (Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, 2004) Bildirimi Zorunlu Balık Hastalıkları Listesi içinde yer almaktayken 12.07.2007 tarih ve 2007/32 sayılı tebliğ ile İhbarı Mecburi Hastalıklar Listesi’nden çıkarılmıştır (GTHB, 2007).

2.1.2 Hastalığın Etiyolojisi

2.1.2.1 Taksonomisi

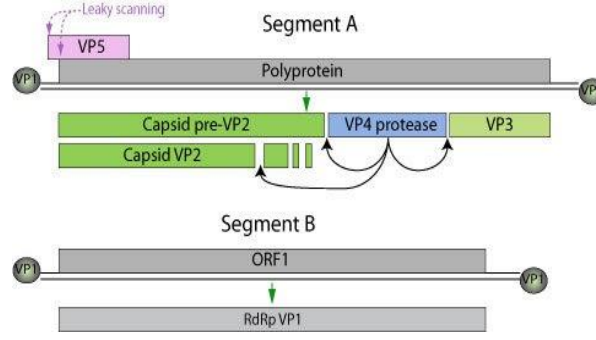
IPNV, Birnaviridae ailesine mensup Aquabirnavirus genusunda yer alan, yaklaşık 6 kbp, çift sarmallı, iki segmentli RNA’ya (dsRNA A ve B) sahip, 55-75 nm çapında, zarfsız ve ikozahedral yapıda, tek katmanlı kapsid ile çevrili bir virüstür (Dobos, 1976; Dobos, 1995a; Dobos ve Rowe, 1977; Macdonald ve Dobos, 1981). Birnaviridae ailesi içerisinde Aquabirnavirüslerin yanısıra İnfeksiyöz Bursal Hastalığı Virüsü’nün (IBDV) içinde bulunduğu Avibirnavirüs ve Drosophila X Virüsü’nün (DXV) içinde bulunduğu Entomobirnavirüs genusu da yer almaktadır (ICTV, 2017). Akuatik birnavirüsler Birnaviridae ailesinin en geniş grubunu oluşturmakta olup en az 32 farklı balık ailesinden, 11 yumuşakça ve 4 farklı kabuklu cinsinden izole edilmiştir (Hill ve Way, 1995).

2.1.2.2 Genomu

Çift segmentli dsRNA genomuna sahip IPNV, ~ 3,1 kb’lik A segmenti ve ~ 2,3 kb’lik B segmentinden oluşur (Dobos, 1976; Dobos ve Rowe, 1977). Segment A genomunda iki adet açık okuma çerçevesi (*Open Reading Frames* (ORF)) bulunmaktadır. Büyük ORF 106 kDa boyutunda olan NH₂-pVP₂-NSprotease-VP₃-

COOH poliproteinini kodlamaktadır. Bu poliprotein üç polipeptide ayrılır. Bunlar major kapsid proteini olan VP2'nin (Viral Protein) öncül proteini olan pVP2 (*Precursor Viral Protein*- Öncül Viral Protein), yapısal olmayan serin-lizin proteaz aktiviteli VP4 ve minor iç kapsid proteini olan VP3'tür (Duncan ve Dobos, 1986; Duncan ve ark., 1987; Havardstein ve ark., 1990; Leong ve ark., 2000; Magyar ve Dobos, 1994; Manning ve Leong, 1990). Küçük olan ORF ise 17 kDa boyutunda, arginin içeriği bakımından zengin, yapısal olmayan bir polipeptidi kodlar (Dobos, 1995a). Bu bölge VP2 bölgesinin N terminal kısmı ile üst üste gelmektedir (Havardstein ve ark., 1990; Magyar ve Dobos, 1994). Bu yapısal olmayan proteini kodlayan bölge VP5 gen bölgesi adı ile anılır. Yapılan çalışmalarda bu protein enfekte hücrelerde tespit edilmiştir (Magyar ve Dobos, 1994).

Segment A; VP2-VP3 adında iki yapısal ve VP4-VP5 adında iki yapısal olmayan dört viral proteini kodlarken Segment B, RNA'ya bağlı RNA polimeraz enzimini (*RNA dependent RNA-polymerase (RdRp)*) sentezleyen ve yapısal olmayan minor internal VP1 proteinini kodlar (Duncan ve ark., 1991). IPNV'ye ait bu 5 viral polipeptidin farklı özellikleri vardır. Bunlardan VP1; RNA polimeraz karakterde ve 95-105 kDa'dur. VP1 proteini toplam virion proteinin yalnızca %4'ünü oluşturmaktadır (Dobos, 1995b). VP2; 46-54 kDa boyutunda major kapsid proteini olup dominant virion proteindir. İnfektivitede ve tip spesifik nötralizan monoklonal antikor üretiminde önemli bir role sahiptir. İnternal virion proteini olan VP3, 31-32 kDa'dur. Yapılan çalışmalar; IBDV'nin VP3 gen bölgesinin virüsün iç yapı proteini olduğunu ve viral yaşam döngüsünde önemli görevleri olduğunu ortaya koymuştur (Maraver ve ark., 2003). VP3, toplam virion proteinin %34'ünü oluşturur. (Dobos, 1995a). VP4; proteaz karakterde yapısal olmayan bir proteindir ve 29 kDa boyutundadır. VP5 de yapısal olmayan bir proteindir ve 17 kDa boyutundadır (Dobos ve Rowe, 1977) (Şekil 1).



Şekil 1: IPNV genom yapısı (http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/571.html)

2.1.3 Genogrupları ve Serotipleri

IPNV'nin içinde bulunduğu Aquabirnavirusler birçok akuatik hayvandan izole edilirken antijenik olarak farklı gruplara ayrılmaktadır. Aquabirnavirus genusuna ait virüsler çapraz nötralizasyon testi çalışmalarına göre A, B, C ve D olmak üzere dört serogruba ayrılmıştır (Mutoloki ve Evensen, 2011; Ruane ve ark., 2009). Poliklonal antikorlarla yapılan nötralizasyon testleri ve monoklonal antikorlarla yapılan enzim immunoassay çalışmaları ile serogrup A içerisinde 9 serotipin bulunduğu belirlenmiştir (Hill ve Way, 1995). Bu serotipler; A1 (WB: West Buxton, VR 299), A2 (Sp: Spjarup), A3 (Ab: Abild), A4 (He: Hecht), A5 (Te: Tellina), A6 (C1: Canada 1), A7 (C2: Canada 2), A8 (C3: Canada 3) ve A9 (Jasper; VR1325) adları ile anılmaktadır (Bowers ve ark., 2008; Caswell-Reno ve ark., 1989; Hill ve Way, 1995).

Serotip A1 Amerika, serotip A6-A9 Kanada, serotip A2-A5 ise Avrupa ve Asya izolatlarından oluşmaktadır (Blake ve ark., 2001; Mutoloki ve Evensen, 2011; Nishizawa ve ark., 2005; Romero-Brey ve ark., 2009). Serogrup B içerisinde ise sadece İngiltere'deki yumuşakçalardan izole edilen B1 (TV-1) serotipi tanımlanmıştır (Hill ve Way, 1995). Bazı araştırmacılar tarafından serogrup A içinde A10 (N1) serotipinin de olduğunu ileri sürmüştü (Christie ve ark., 1988) ancak daha sonra bu serotipin Sp serotipi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Melby ve Christie, 1994). Geniş konakçı ve coğrafi dağılımına rağmen, izolatların büyük çoğunluğu antijenik olarak referans serotiplerle (WB, Sp ve Ab) büyük benzerlik göstermektedir.

IPNV'ler arasında antijenik varyasyonun çeşitlilik gösterdiği birçok araştırma ile ortaya konmuştur (Caswell-Reno ve ark., 1986; Lee ve ark., 1996; Ruane ve ark., 2009). Dış kapsid proteini olan VP2, koruyucu antikor cevabını oluşturan ana nötralizasyon epitoplarını içermektedir (Song ve ark., 2005) ve daha önce yapılan çalışmalarda VP2'nin konakçı hücrede tip spesifik monoklonal antikor üretimini uyardığı bildirilmiştir (Caswell-Reno ve ark., 1989; Dobos, 1995a; Heppell ve ark., 1995; Melby ve Christie, 1994; Nicholson, 1993). Bu nedenle VP2, en önemli virülens faktörlerinden biridir ve genotiplendirmede kullanılmaktadır (Das ve ark., 2007; Moon ve ark., 2004; Labus ve ark., 2001). Kapsid proteininin (VP2) aminoasit sekans çalışması yapılarak suşların coğrafi kökeni ile serolojik sınıflandırması arasında bir bağlantı olduğu ortaya konmuştur (Hill ve Way, 1995). VP2 gen bölgesi üzerinde yapılan moleküler filogenetik çalışmalarda IPNV'lerin 6 farklı genogrup içinde 9 serotipe ayrıldığı bildirilmiş fakat genogrup sayısının farklı coğrafi bölgelerdeki balıklardan izole edilen virüs suşlarının sekans çalışmaları ile artabileceği belirtilmiştir (Blake ve ark., 2001; Cutrin ve ark., 2004).

Tablo 1: Bağışıklıktan sorumlu yüzey glikoproteini olan VP2 baz alınarak yapılan sınıflandırmada ortaya konulan 6 genogrup.

Genogrup	Serotip
Genogrup I	Serotip A9 (Ja) ve A1 (WB)
Genogrup II	Serotip A3 (Ab)
Genogrup III	Serotip A2 (Sp) ve serotip B1 (TV-1)
Genogrup IV	Serotip A5 (Te) ve A6 (C1)
Genogrup V	Serotip A7 (C2) ve A8 (C3)
Genogrup VI	Serotip A4 (He)

Bunlara ek olarak genogrup III ve IV içerisinde bulunan A2-A5 serotiplerinin başlıca Avrupa izolatlarını oluşturduğu ortaya konmuştur (Bain ve ark., 2008; Blake ve ark., 2001; Brey ve ark., 2009; Cutrin ve ark., 2004). Balıklardan izole edilen IPNV suşlarının çoğunlukla serotip A1 (WB), A2 (Sp) ve A3 (Ab) içerisinde yer aldığı bildirilmiştir (Hill ve Way, 1995).

Türkiye’de Bornova Veteriner Araştırma Enstitüsü tarafından 2004-2011 tarihleri arasında izole edilen 112 adet IPNV izolatından 38 tanesi Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı olan *Danish Institute for Food and Veterinary Research* tarafından Sp serotipi olarak serotiplendirilmiştir (Kalaycı ve ark., 2012).

2.1.4 Replikasyonu

Chinhook Somon Embriyo (CHSE-214) hücrelerinde IPNV replikasyon döngüsünün 15°C’de yaklaşık 24 saat veya 22°C’de 16-20 saat sürdüğü bildirilmiştir (Dobos, 1995b; Lannan ve ark., 1984). IPNV’nin, diğer zarfsız hayvan virüslerinde olduğu gibi, hücrelere spesifik olarak bağlandıktan sonra reseptör aracılı endositoz ile konakçı hücreye girdiği görülmektedir (de las Heras ve ark., 2008; Granzow ve ark., 1997; Kuznar ve ark., 1995). IPNV’nin, CHSE-214, BF-2 (Bluegill Fry) ve EPC (Epithelioma Papulosum Cyprini) gibi balık hücre hatlarına spesifik olarak bağlandığı ortaya konmuştur (de las Heras ve ark., 2008). IPNV’nin replikasyon döngüsünün sitoplazmada gerçekleştiği rapor edilmiştir (Cohen, 1975). Viral mRNA’nın (*Messenger RNA*-haberci RNA), enfeksiyondan 4-6 saat sonra tespit edilebileceği ve daha sonra hücre içerisinde virüse özgü polipeptidlerin oluştuğu bildirilmiştir. Enfeksiyondan 8-10 saat sonra viral RNA’nın sentezinin en yüksek seviyesine ulaştığı bilinmektedir (Dobos, 1995b). Herhangi bir ekzositoz veya başka bir virüs salınım mekanizması gözlemlenmediği için viral soyların hücrelerden nasıl salındığı belirsizdir (Granzow ve ark., 1997).

2.1.5 Virülens Faktörleri

Viral genom, konakçı bağışıklık sistemi tarafından uygulanan güçlü seleksiyon baskısı altındadır. İlk olarak Sano ve ark. (1992) Segment A’nın IPNV’nin virülensiyle ilişkili olduğunu belirtmiştir. Atlantik somon (*Salmo salar*) yetiştiriciliğindeki IPN salgınlarında mortalitenin %6-90 arasında değiştiği rapor edilmiştir. Mortalitedeki değişkenliğin nedenini belirlemek amacıyla, IPNV izolatlarının genomik dizilemesi yapılarak virülens varyasyonlarının moleküler temeli incelenmiştir (Blake ve ark., 2001; Santi ve ark., 2004). Yapılan çalışmalarda, VP2 (Blake ve ark., 2001; Santi ve ark., 2004) ve VP5 (Santi ve ark., 2004) gen bölgelerinin sekanslarında farklılıkların olduğu ortaya konmuştur. VP2 sekansında

belirli amino asitlerdeki değişimin, bir suşun virülensinin belirlenmesinde önemli olduğu bildirilmiştir. Sekans analizi sonuçlarına göre VP2 gen bölgesinin VP1, VP3 ve VP4 göre daha fazla genetik varyasyon içerdiği ortaya konmuştur (Santi ve ark., 2004).

2.1.5.1 VP2 Gen Bölgesi

VP2 proteini, virüsün hücreye tutunma bölgesidir. VP2 gen bölgesi virüsün dış kapsid proteinini kodlar ve bu da konakçıda nötralizasyon antikorlarının oluşmasına neden olur. Bu bölge dış kapsid proteinlerini kodladığından virüsün hücreye tutunma mekanizmasını düzenler (Dobos, 1995a). Filogenetik analizlerde kullanılan VP2 gen bölgesi, IPNV'nin ana yapısal immunojenik bölgesini kodlar ve çok hızlı varyasyona uğrayan polipeptidlerden oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda nötralizan monoklonal antikorların büyük çoğunluğunun VP2 proteininde bulunan epitoplarla etkileşime geçtiği ortaya konmuştur (Caswell-Reno ve ark., 1986; Christie ve ark., 1990; Frost ve ark., 1995; Liao ve Dobos, 1995; Tarab ve ark., 1993, 1995). VP2 gen bölgesinin 204-330. amino asit dizileri arasında iki değişken bir de korunmuş nötralizasyon epitoplarını kodlayan 3 bölgenin olduğu ortaya konmuştur. VP2 gen bölgesi üzerinde 199., 217., 221., 247., 286., 500. aminoasit pozisyonlarındaki farklılıkların mortalite oranına etki ettiği bildirilmiştir (Frost ve ark., 1995).

IPN salgınlarında değişken mortalite görülmesi suşların sahip olduğu virülens farklılıklarından kaynaklanmaktadır. VP2 gen bölgesindeki özel amino asit pozisyonlarının zamanla değişikliğe uğraması bu virülens farklılıklarına neden olmaktadır. Bu gen bölgesi tarafından kodlanan 217., 221. ve 247. amino asit dizileri IPNV suşunun virülensinde belirleyici rol oynamaktadır (Santi ve ark., 2004). Zira;

- 217'de Treonin, 221'de Alanin (T₂₁₇A₂₂₁) taşıyan suşların yüksek virüent,
- 217'de Prolin, 221'de Alanin (P₂₁₇A₂₂₁) taşıyan suşların orta düzeyde virüent,
- 217'de Treonin, 221'de Treonin (T₂₁₇T₂₂₁) veya 217'de Prolin, 221'de Treonin (P₂₁₇T₂₂₁) taşıyan suşların ise düşük/avirüent olduğu belirlenmiştir

(Bain ve ark., Gadan ve ark., 2013; Julin ve ark., 2013; 2008; Santi ve ark., 2004; Santi ve ark 2005; Song ve ark., 2005).

Zaman içerisinde virüs genomunda oluşan mutasyonlara bağlı olarak avirulent suşların virulent hale geçebildiği bildirilmektedir (Gadan ve ark., 2013). Bu nedenle genetik düzeyde yapılacak olan epidemiyolojik çalışmalarda en yakın tarihte izole edilen izolatların kullanılması önemlidir.

VP2 bölgesindeki 221. amino asit pozisyonunun persiste enfeksiyonla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu pozisyonda treonin amino asidini kodlayan suşlarla enfekte edilen balıkların tamamında persiste enfeksiyon olduğu, alanin kodlayan suşlarla enfekte edilen balıkların ise bir kısmının persiste enfekte olduğu bildirilmiştir (Song ve ark., 2005).

2.1.5.2 VP5 Gen Bölgesi

IPNV'nin VP5 gen bölgesi konakçı hücrede antiapoptozis yolunu düzenlemektedir (Hong ve ark., 2002). Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda VP5 proteininin başlangıç kodonunda varyasyonların bulunduğu ve bunun genotiplendirmede kullanılabilmesi ortaya konmuştur (Davies ve ark., 2010; Heppell ve ark., 1995; Magyar ve Dobos, 1994; Shivappa ve ark., 2004; Weber ve ark., 2001). Santi ve arkadaşları 2004 yılında yayınladıkları bir çalışmada A segmentinin nükleotid sekansında en çok varyasyon bulunan bölgenin VP2 daha sonra da VP5 olduğunu belirtmiştir (Santi ve ark., 2004).

Apoptozis, hücrenin programlı ölümü olarak bilinen ve virüslerin hücrede replikasyonunu sınırlayarak hastalığın baskılanmasında doğal immun yanıt olarak görev yapan bir prosestir (Everett ve McFadden, 1999). Birnavirade ailesinin diğer bir üyesi olan IBDV'nin, enfekte tavukların dokularında ve peripheral kan lenfositlerinde apoptozu indüklediği ortaya konmuştur (Lam, 1997; Tanimura ve Sharma, 1998; Vasconcelos ve Lam, 1994). Hem IBDV hem de IPNV'nin VP5 gen bölgesinin virüsün replikasyonunda elzem olmadığı ortaya konmuş (Mundt ve ark., 1997; Santi ve ark., 2005; Weber ve ark., 2001) fakat fonksiyonlarının farklı olabileceği düşünülmektedir. IBDV ile enfekte hücre kültürden eksprese edilen VP5 proteinlerinin hücre membranında birikerek membran geçirgenliğini değiştirip

apoptozu indüklediği bilinmektedir (Lombardo ve ark., 2000; Yao ve Vakharia, 2001). Fakat henüz IPNV’de VP5’in tam olarak hücredeki fonksiyonları ortaya konulamamıştır.

Hong ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada VP5’in antiapoptotik etkisi olduğunu bildirirken Santi ve ark. (2005) ise yaptıkları in vitro ve in vivo çalışmalarda VP5’in antiapoptotik etkilerine rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Bu durumun, her iki çalışmada kullanılan virüs suşlarının farklı olmasına bağlı olabileceği ve ileri çalışmalara gerek duyulduğu sonucuna varmışlardır (Hong ve ark., 2002; Santi ve ark., 2005). Bu da VP5 gen bölgesinin sekans çalışmalarının önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

2.1.6 Epizootiyolojisi

IPNV, hem deniz hem de tatlı su balıklarında hastalık oluşturabilen bir virüstür. Salmonid olmayan balık türlerinden japon balığında (*Carassius auratus*), diskusta (*Symphysodon discus*), çapak balığında (*Abramis brama*), kalkanda (*Scophthalmus maximus*), sarıkuyrukta (*Seriola quinqueradiata*), yılan balığında (*Anguilla anguilla*), çizgili levrekte (*Morone saxatilis*), halibutta (*Hippoglossus hippoglossus*), Atlantik koddada (*Gadus morhua*) ve levrekte (*Dicentrarchus labrax*) hastalık oluşturduğu bilinmektedir (OIE, 2006). IPNV’nin, Amerika, Avrupa, Asya, Avustralya ve Güney Afrika’daki salmonid kuluçkahanelerinde çok yaygın olduğu bilinmektedir (Crane ve ark., 2000; Davies ve ark., 2010). Virüs, özellikle yavru gökkuşuğu alabalıklarında (*O. mykiss*) %70’e varan mortaliteye sebep olabilmektedir (Roberts ve Pearson, 2005; Wolf ve ark., 1960). Kümülatif mortalitenin; virüs suşuna (McAllister ve Owens, 1986), virüs dozuna (Bebak ve McAllister, 2009) ve su sıcaklığı gibi çevresel faktörlere (Bebak-Williams ve ark., 2002) bağlı olarak %10 ile %90 arasında değiştiği kaydedilmiştir. IPNV’nin, gökkuşuğu alabalığı (*O. mykiss*) da dahil olmak üzere birçok balık türünde gametler aracılığıyla sonraki nesillere vertikal olarak bulaştığı kesin olarak ortaya konmuştur (Ahne ve Negele, 1985; Bullock ve ark., 1976; Dorson ve Torchy, 1985; Smail ve Munro, 1989; Wolf ve ark., 1968). Hastalığı geçirmiş olan balıklar virüsün taşıyıcısı konumuna geçerek uzun süre virüsün etrafa saçılımında rol oynamaktadır (Munro ve Midtlyng, 2011).

IPNV enfeksiyonunun çok geniş bir coğrafyada yaygın görülmesinin nedeni ülkeler arasında yapılan virüsle enfekte yumurta ve yavru balık alışverişidir. Bu yolla Norveç'ten uzun yıllar yumurta ve yavru ithal eden Şili'de ortaya çıkan IPN salgınlarında Norveç kaynaklı IPNV'ler izole edilmiştir (Mutoloki ve Evensen, 2011).

Hastalığın çıkış noktasının IPNV ile enfekte kuluçkahaneler ve asemptomatik taşıyıcı balıklar olduğu düşünülmektedir. Virüs, taşıyıcı balıkların sperm, yumurta ve dışkıları ile dış ortama yayılmaktadır (Dopazo ve Barja, 2002; Wolf, 1988). Bulaşma; virüsle kontamine olmuş materyalle direkt temas yoluyla, solungaçlar ve sindirim sistemi kanalı yoluyla, vertikal olarak da yumurta ve sperm aracılığıyla olmaktadır (Dopazo ve Barja, 2002).

IPNV deneysel enfeksiyon ile tavuk, baykuş, martı ve mink gibi çeşitli hayvan türlerinden tekrar izole edilmesine rağmen bu hayvan türlerinde doğal enfeksiyon yaptığı gösterilememiştir. Bu da kanatlı ve memeli hayvanların IPNV'nin yayılmasında mekanik vektör olduğunu düşündürmektedir (Schlotfeldt, 1979). IPNV ile kontamine çiftliklerin atık suları ile virüsün doğal balıklara bulaştığı ve çevreye virüsün yayıldığı bildirilmiştir (McAllister ve Bebak, 1997).

İspanya'da yapılan bir çalışmada salgınların sıcak bölgelerde ilkbahar aylarında, daha serin bölgelerde ise ilkbahar sonu ve yaz aylarında görüldüğü saptanmıştır (Sanjuan ve ark., 1994). Yavru balıklarda klinik bulgular tipik olarak 3-5. günlerde gözlenmektedir (Frantsi ve Savan, 1971; McAllister ve Owens, 1986; Silim ve ark., 1982; Wolf, 1988). En yüksek mortalite genellikle 12-18. günler arasında görülür. Hastalık gelişimi için optimum sıcaklık 10°C-14°C arasında değişmektedir (Noga, 1996). IPN, genellikle yavru balıklarda mortaliteye neden olmakla birlikte, deniz suyuna transfer edilen Atlantik somonlarda (*S. salar*) da yüksek ölüm oranı bildirilmiştir (Melby ve Christie, 1994; Smail ve ark., 1992).

Yüksek mortalite genellikle yavru ve parmak boydaki balıklarda görülmektedir. Hastalığın yaygın olduğu yerlerde, çevresel koşulların iyi olmadığı, balık yoğunluğunun ve stresin fazla olduğu çiftliklerde erişkin balıklarda da mortalite oranının % 30-40'a ulaştığı bildirilmiştir (Kalaycı ve ark., 2012).

Türkiye’de Bornava Veteriner Araştırma Enstitüsü tarafından yapılan epidemiyolojik tarama çalışmalarında hastalığın aynı kaynaktaki işletmelere suyla yayıldığı, farklı yerlerdeki işletmelere ise yumurta ve yavru balık alışverişi ile bulaştığı belirlenmiştir (Kalaycı ve ark., 2012). Değirmenci ve ark. (2008) tarafından 2003-2008 yılları arasında Marmara, İç Anadolu, Ege ve Güneydoğu Anadolu bölgelerindeki gökkuşağı alabalıklarından (*O. mykiss*) toplam 21 IPNV suşu izole edilmiştir. Toplu ve ark. (2010), bir alabalık işletmesinde nekropside herhangi bir belirtiye rastlamamalarına rağmen, Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile IPNV varlığını tespit etmişlerdir.

2.1.7 Klinik Belirtileri

IPN hastalığının belirtileri konakçının türüne, yaşına, virüsün serotipine ve su sıcaklığına göre değişebilmektedir (Frantsi ve Savan, 1971). Akut IPN, 1-4 aylık balıklarda görülür ve kümülatif mortalite %10-90 değişir. Altı aylıktan büyük balıklarda hastalık subklinik ve/veya asemptomatik olarak seyreder. Yaşlı balıklarda hastalık, stres nedeniyle yeniden aktive olabilir (Çağırğan ve ark., 1996). Hasta balıklarda iştahsızlık, özellikle vücudun arka 1/3’lük kısmında renk koyulaşması, ekzoftalmus, spiral yüzme, asites, solungaçlarda solgunluk, uzamış halde dışkı (pseudofeces) görülen en tipik semptomlardır. İç organların incelemesinde mide ve bağırsakların boş olduğu, sarı, jelatinimsi bir eksudat ile dolu olduğu, bazı yavru balıkların dalak, kalp, karaciğer ve böbreklerinin solgun olduğu, pilorik seka ve anterior adipoz dokuda peteşiyel kanamaların olduğu ve karın boşluğunda asites görüldüğü bildirilmiştir (Noga, 1996; Wolf, 1988; Yasutake, 1975). IPNV’nin, salmonid olmayan balık türlerinden sarı kuyrukların (*S. quinqueradiata*) baş bölgesinde hemoraji ve asites, Japon yılan balıklarında (*A. japonica*) nefrit, kalkan balıklarında (*S. maximus*) hematopoyetik dokuda nekroz, levrek (*D. labrax*) larvalarında spiral şekilde yüzme, hava kesesinde şişkinlik ve ekzoftalmusa neden olduğu bildirilmiştir (Dopazo ve Barja, 2002; Noga, 1996; Wolf, 1988).

2.1.8 Patogenezi

IPNV'nin vücuda solungaçlar ve sindirim yolu ile girdiği bilinmektedir (Dopazo ve Barja, 2002; Smail ve Munro, 1989). Hastalığın inkübasyon süresi; su sıcaklığı, balığın yaşı, türü, virüs miktarı ve etkenin virülensine göre değişmektedir. IPNV ile yapılan deneysel enfeksiyonlarda immersiyon yolu ile virüsün balıklara verilmesinden 6-20 gün sonra ölümlerin başladığı görülmüştür. Virüsün enjeksiyon yoluyla verilmesinden sonra ise 3-10 gün içerisinde balıklarda ölümlerin başladığı gözlemlenmiştir. Su sıcaklığının 10-16°C arasında olduğu zamanlarda hastalığın inkübasyon periyodunun en kısa olduğu, en fazla ölümlerin ise 10-13°C arasında gerçekleştiği görülmektedir. 4-6°C arasında ve 16°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ölüm oranının düştüğü bildirilmektedir. Salgınların 4-6°C'de 4 ay, 10-16°C'de ise 36 hafta sürebildiği belirtilmiştir (Dopazo ve Barja, 2002).

Yapılan deneysel enfeksiyondan sonraki 40 günlük süre içerisinde IPNV, plazmadan ve başta mononükleer hücreler olmak üzere lökositlerden izole edilmiştir. İntraperitoneal enjeksiyon ile oluşturulan enfeksiyondan sonra viral antijenin floresan antikor tekniğiyle (FAT) 3. günde pankreasta, 9. günde ise böbrekte bulunduğu gösterilmiştir. Virüsün taşıyıcı balıklarda klinik belirti göstermeden ön böbrekten ve lökositlerden 3 yıla kadar izole edilebildiği belirtilmiştir (Smail ve Munro, 1989).

2.1.9 Patolojisi

IPN hastalığında histopatolojik bulgularının virüsün serotipine, konakçıya ve çevresel koşullara bağlı olarak değişebildiği bildirilmiştir (Smail ve Munro, 1989). Özellikle pankreasın ekzokrin salgı dokularında nekroz tablosu göze çarpmaktadır (Çağırğan ve ark., 1996). Pankreas nekrozu genellikle fokal olmakla birlikte asiner dokuda lenfositik infiltrasyon bulunur. Enfeksiyonu atlatan balıklarda ekzokrin doku, yağ doku ile dolar. Bağırsaklardaki patolojik bozukluklar sadece klinik olarak hastalık belirtisi gösteren balıklarda görülür. Hasta balıklarda bağırsak mukozasında dökülme veya nekroz ile karakterize kataral enterit tablosu vardır. Pilorik seka epitel hücrelerinde McKnight hücreleri şekillenir. Böbrekteki hematopoitik dokuda ödem ve nekroz vardır. Histopatolojik incelemede karaciğerin çok az etkilendiği görülür (Noga, 1996; Yasutake, 1975; Wolf ve Qimby 1970). Enfeksiyonu geçirmiş taşıyıcı

balıklarda 2,5 yaşına gelinceye kadar ekzokrin pankreasın %75'inde dejeneratif bulgular görülebilir. Ekzokrin pankreas dokusunun %75'i dejenere olsa bile kalan kısmı sindirim işlevinin görülmesi için yeterlidir (Smail ve Munro, 1989). Bunlara ek olarak Atlantik somon (*S. salar*) yavrularında yapılan deneysel enfeksiyonda karaciğerde şiddetli nekroz tablosu olduğu bildirilmiştir (Santi ve ark., 2004; Taksdal ve ark., 1997).

2.1.10 Teşhisi

IPNV'nin identifikasyonu hücre kültüründen virüsün izolasyonunu takiben immunolojik testler uygulayarak yapılmaktadır (Agius ve ark. 1982; Sanz ve Coll, 1992; Smail ve Munro, 1989; Wolf, 1970). İdentifikasyon amacıyla; nötralizasyon ve %50 plak nötralizasyon (Hill, 1977; Vestergard ve ark., 1971), FAT (Swanson ve Gillespie, 1981), immunperoksidaz (Fasial ve Ahne, 1980), komplement fikzasyon (Finlay ve Hill, 1975), counterimmunoelktroforez, koaglutinasyon (Kimura ve ark., 1984), ELISA (Enzymelinked immunoassay) (Nicholson ve Caswell, 1982), immunoblot (McAllister ve Schill, 1986), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) (Lopez Lastra ve ark., 1994) testleri kullanılabildiği bildirilmiştir.

IPNV'nin izolasyonu için Atlantik Somon (AS), BF-2, CHSE-214, EPC ve Rainbow Trout Gonad (RTG-2) gibi birçok hücre hattının duyarlı olduğu bildirilmesine rağmen rutin teşhiste duyarlılığı en fazla olan CHSE-214 ve BF-2 hücre hatları kullanılmaktadır (Wolf, 1988; Lidgerding, 1981). IPNV'nin hücre kültüründe izolasyonunda kullanılan sıcaklık 15-20°C'dir. Genellikle 48 saat içinde hücre kültüründe CPE (Sitopatik etki) görülür. IPNV'nin oluşturduğu CPE ilk 24 saat içinde çekirdek piknozu ve gözle görülebilir küçük plaklar, 48-72. saatte içinde ise total hücre yıkımıyla karakterizedir (Smail ve Munro, 1989). IPNV'yi dokudan direkt olarak tespit etmek amacıyla RT-PCR test metodu da kullanılmış ve bu metodun birçok araştırmacı tarafından en hassas metot olduğu bildirilmiştir (Dopazo ve Barja, 2002; Taksdal ve ark., 2001). Blake ve ark. (1995) IPN hastalığının teşhisinde, hücre kültüründen virüs izole edilmesi ve RT-PCR metodunun %100 aynı sonucu verdiği bildirmiştir.

2.1.11 İmmunitesi

Memelilerde olduğu gibi balıklarda da patojen etkenlere karşı spesifik ve non-spesifik immun savunma sistemleri vardır. Salmonid balıklarda IPNV'ye karşı non-spesifik savunmanın sitokinlerden tip I interferon (IFN) aracılığı ile olduğu bildirilmektedir. Humoral immun sistem ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır (Larsen ve ark., 2004; Mackelvie ve Desautels, 1975). Yapılan bir çalışmada erişkin alabalıklara IPNV'nin VR299 serotipi enjekte edilmiş ve birkaç ay sonra balıklarda nötralizan antikorlar tespit edilmiştir (Wolf ve ark., 1969). Taşıyıcı balıkların serumlarında da nötralizan antikor tespit edilmiş ve bu antikorum tetramerik yapıda (IgM benzeri yapıda) olduğu görülmüştür (Smail ve Munro, 1989). Yapılan çalışmalarda attenüe ve formalin ile inaktive edilmiş IPNV'nün ergin alabalıklara enjekte edilmesiyle immun yanıtın ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Dixon ve Hill, 1983). Hastalığı geçiren yavru alabalıklarda bağışıklık oluştuğu bildirilmiştir (Wolf, 1988).

IFN'ler, balıklarında viral etkenlere karşı vücudu savunan ilk mekanizmadır. IFN'lerin varlığı salmonid balıklar da dahil olmak üzere birçok kemikli balıkta bildirilmiştir (Robertsen et al., 2003; Robertsen, 2006; Robertsen, 2008; Zhang ve ark., 2007). Bu IFN'lerin IPNV gibi çift iplikçikli RNA'ya sahip virüsler tarafından uyarıldığı bilinmektedir (Abbas ve ark., 2000; Sen, 2001). Salgılanan IFN'ler konakçı hücre reseptörlerine tutunarak Mx ve Viperin (Vip) gibi antiviral aktiviteli birçok proteinin oluşması için bu proteinleri kodlayan immun genleri aktive eder. (Sadler ve Williams, 2008; Takeuchi ve Akira, 2007). Yapılan çalışmalarda IFN'lerin IPNV'ye karşı antiviral etkisinin olduğunu ve bu virüse karşı Mx ve Vip immun genlerini aktive ettiği ortaya konmuştur (Svingerud ve ark., 2012). Mx immun geni tarafından kodlanan Mx proteininin balıkların virüslere karşı oluşturduğu immun yanıt çalışmaları hem in vitro hem de in vivo ortamda yapılmıştır (Jensen ve Robertsen, 2000; Jensen ve ark., 2002). IFN'lerin viral nükleik asit varlığında Mx ve Vip gibi antiviral etkili immun genleri stimule ettiği keşfedildiğinde bunun viral etkenlere karşı profilaktik amaçlı kullanılabileceği düşünülmüştür (Abbas ve ark., 2013; Chin ve Cresswell 2001; Sadler ve Williams, 2008; Takeuchi ve Akira, 2007). Buna yönelik yapılan bir çalışmada gökkuşağı

alabalıklarına (*O. mykiss*) intraperitoneal olarak verilen IFN'lerin İnfeksiyöz Hematopoitik Nekrozis Virüsü (IHNV) enfeksiyonlarına karşı 7 güne kadar koruyuculuk sağladığı ortaya konmuştur (Ooi ve ark., 2008).

Yapılan birçok çalışmayla, Mx ve Vip gen uyarımının RT-qPCR ile tespit edilebileceği ve IFN yanıtının RT-qPCR'ın yanında işaretlenmiş antikolar kullanılarak da belirlenebileceği gösterilmiştir (Nygaard ve ark., 2000; Robertsen ve Trobridge, 1997; Trobridge ve ark., 1997a; Trobridge ve ark., 1997b). Tüm bu antiviral etkiler yüksek vertebralılarda tam olarak tanımlanmış olmasına rağmen balıklarda ileri detaylı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

2.1.12 Kontrolü

Hastalığın eradikasyonu için hızlı ve doğru teşhis, etkili kontrol ve hastalığın epizootiyolojisinin anlaşılması oldukça önemlidir (Nicholson ve Caswell, 1982). En etkili ve en ekonomik kontrol yöntemi hastalıktan korunmadır. Bunun için virüsün bulaşma kaynağı bilinmeli ve bu kaynaklar ortadan kaldırılmalıdır. IPNV'den ari sertifikalı yumurtalar ve balıklar işletmeye alınmalıdır. IPNV'nin taşıyıcısı olabilecek mekanik vektörler (kuşlar, omurgasızlar vb.) ve diğer dış enfeksiyon kaynaklarıyla (ziyaretçiler, balık çiftliğinde kullanılan alet ve ekipmanlar) ilgili tedbirler alınmalıdır (Schlotfeldt, 1979).

IPNV, diğer zarfsız virüslerde olduğu gibi eter, kloroform ve gliserolle inaktive olmazken iyodofor ve ozon ile inaktive edilebilmektedir (Çağırğan ve ark., 1996). Kullanılan iyodoforun pH 6-8 arasında olması gereklidir. pH 6'nın altındaki değerlerde kullanılan iyodofor gözlenmiş veya yeni döllenmiş yumurtalarda toksik etkiye neden olmaktadır. Bu nedenle pH kontrolü için suya NaHCO₃ eklenmelidir. Buna ilaveten yumurtaların 100 ppm iyodofor ile dezenfeksiyonundan önce ve sonra %0.9'luk tuzlu su ile yıkanmaları önerilir. Ayrıca yumurtaların iyodofor içinde 10 dakikadan az tutulmamaları ve solüsyonun bir defaya mahsus kullanılması önemlidir (OIE, 2006).

Kuluçkahanelerde hastalığın bulaşmasını önlemek amacıyla gözlenmiş yumurtalara iyodoforla (100 ppm 10 dakika süreyle) dezenfeksiyon yapılması önerilmektedir. Ancak bu uygulama yumurta dışındaki virüsü inaktive etse de

embriyo içerisindeki virüslere etkili değildir (Smail ve Munro, 1989). Kullanılan malzemeleri dezenfeksiyon amacıyla 1 saat süreyle 200 mg/l aktif kloro maruz bırakmak gerekir (Çağırğan ve ark., 1996). Bunların yanında işletmedeki ekipmanların dezenfeksiyonunda 200-250 ppm iyodofor, 50 ppm klorin ve %1'lik sodyum hidroksit de ekipman temizliğinde ve ayak banyosunda etkili olduğu belirtilmiştir (OIE, 2006). Stok yoğunluğun az olduğu yerlerde, yüksek stok yoğunluklu yerlere göre enfeksiyon oranının daha az olduğu bildirilmektedir (Schlotfeldt, 1979). PVP-iyot, epsilon amino kaproik asit, tranexanic asit gibi antiviral kematerapötiklerin mortaliteyi azalttığı fakat kesin olarak tedavi etmediği bildirilmiştir (Çağırğan ve ark., 1996).

Mianiensis avidum ve *Tetrahymena sp.* gibi protozoonlar, ıstakozlar ve birçok kanatlı hayvanın virüsü mekanik olarak taşıdığı bilinmektedir (Wolf, 1988). Bu nedenle kuşların havuzlardan uzak tutulması ve parazit mücadelesi koruma ve kontrolde önemlidir.

Tankların ve havuzların rutin dezenfeksiyonunda ozon veya klorin (yaklaşık 1600 ppm) kullanımı önerilmektedir. Bunlara alternatif olarak %1'lik sodyum hidroksit de havuz ve tankların dezenfeksiyonunda kullanılabilirliği belirtilmiştir. İşletmeye giren suyun dezenfeksiyonu hastalıkların önlenmesinde çok önemli bir yere sahiptir. Bunun için suyun filtrelerden geçirilmesi, ozona maruz bırakılması ve UV (Ultra Viyole) ışınlarından geçirilmesi gibi yöntemler uygulanır (OIE 2006).

2.1.13 Aşılması

Viral balık patojenlerine karşı geliştirilen DNA aşılı son on yılda oldukça dikkat çekmiştir. Çalışmaların çoğunluğu özellikle rhabdovirüslerin glikoproteinlerini kodlayan unsurları içeren DNA aşılı üzerinde yoğunlaşmıştır (Kurath, 2008; Lorenzen ve LaPatra, 2005; Tonheim ve ark., 2008). DNA aşılılarında genellikle tek doz, güçlü bir immün yanıt başlamasını sağlayabilir ve hastalığa karşı oluşan direnç en az 2 sene sürebilir. Güçlü etkisi ve uzun süreli koruma sağlanması nedeniyle ilk lisanslı DNA aşısı 2005 yılında Kanada'da IHNV'ye karşı hazırlanmıştır (Appex-IHN, Aqua Health Ltd.). Rhabdovirüsler dışındaki virüsler için hazırlanan DNA aşılı balıklarda daha düşük koruma sağlamış ve immün

yanıtın başlama ve edinsel cevabın oluşma mekanizması tam olarak anlaşılammıştır (Kurath, 2008; Lorenzen ve LaPatra, 2005; Tonheim ve ark., 2008). IPNV'ye karşı yapılmış ilk DNA aşısı çalışmasında VP2 genini içeren iki plazmid kullanılmış ve Atlantik somonlarda (*S. salar*) %84 koruyuculuk sağladığı bildirilmiştir (Mikalsen ve ark., 2004). Enfeksiyon genel olarak çok genç yaşta olduğundan intraperitoneal aşılama yapılması çok zordur. Bu nedenle aşılama için farklı yollar tercih edilir. Şili'de bir maya (*Pichia pastoris*) tarafından üretilen VP2 ve VP3 rekombinant proteinlerinden oluşmuş lisanslı, oral IPNV aşısı mevcuttur (AquaVac IPN Oral; Intervet). IPNV'ye karşı inaktif ve rekombinant aşılarda ticari olarak bulunmakla birlikte, hastalığın, ilk yem alma dönemindeki larvalarda görülmesinden dolayı pratikte değeri tartışmalıdır. Hastalığın kontrolü için yapılan aşısı çalışmaları özellikle DNA aşısı ile ilgili olarak devam etmektedir (Biering ve ark., 2005; Leong ve ark., 2001; Lorenzen ve LaPatra, 2005). IPNV genomundaki mutasyonlara bağlı olarak avirulent suşların virulent hale geldiği bildirilmektedir. Bu nedenle doğal attenüe suşlar canlı aşısı olarak kullanılamamaktadır (Gadan ve ark., 2013).

IPNV'ye karşı etkili bir tedavi metodu olmamasından dolayı, erken tanı, korunma ve hijyen tedbirleri hastalıkla mücadelede önemli bir yer tutmaktadır. Balıkçılık endüstrisi gelişmiş ülkelerde IPNV'ye karşı yerli suşlarla üretilen farklı aşısı tipleri kullanılmakla birlikte Türkiye'de IPNV'ye karşı lisanslı herhangi bir aşısı bulunmamaktadır.

2.2 Viral Hemorajik Septisemi

2.2.1 Tarihçesi

Viral Hemorajik Septisemi (VHS) hastalığı ilk kez 1938 yılında Schäperclaus tarafından gökkuşağı alabalıklarında (*O. mykiss*) Şişkin Böbrek Sendromu (*Nierenschwellung*) adı ile tanımlanmıştır (Schäperclaus, 1938). Benzer belirtiler 1946 yılında Polonya'nın güneyinde Pliszka tarafından da bildirilmiştir. 1950'li yılların başında Danimarka'da da görülen bu hastalık "Egtved Hastalığı" (Rasmussen, 1965; Schäperclaus, 1954), Fransa'da ise "Bulaşıcı Anemi" (Besse, 1955) olarak isimlendirilmiştir. Virüsün, 1963 yılında Jensen tarafından alabalık hücre kültüründe ilk kez izole edilmesinin ardından hastalığın viral etiyolojisi

hakkında bilgi edinilmeye başlanmıştır. Aynı yıl yapılan Uluslararası Balık Patologları toplantısında bu hastalığa Viral Hemorajik Septisemi Hastalığı adı verilmiştir. Viral Hemorajik Septisemi Virüsü (VHSV) literatürde, ilk defa Danimarka'nın Egtvet köyünden izole edildiği için Egtvet Virüsü olarak da geçmektedir.

VHS hastalığına sebep olan VHSV, deniz balıklarından ilk kez 1979 yılında Yeni Zelanda'nın güney kıyı sularında Atlantik morinasından (*Gadus morhua*) (Jensen ve ark., 1979; Jørgensen ve Olesen, 1987), daha sonra 1993 ve 1995 yıllarında İskoçya'nın batı kıyı sularındaki morina (*Melanogrammus aeglefinus*) balıklarından izole edilmiştir (Smail, 1995; Smail, 2000). Virüs, 1988 yılında Amerika'da coho somon (*Oncorhynchus kisutch*) balıklarının ovaryum sıvılarında bulunmasıyla Amerika kıtasında ilk kez rapor edilmiştir (Brunson ve ark., 1989; Hopper, 1989). Asya kıtasından ise ilk defa 2001 yılında Japonya ve Kore'deki Japon dil balıklarından (*Paralichthys olivaceus*) izole edilmiştir (Thrusfield, 2007). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, VHSV'nin Amerika, Kanada, Japonya, Kore ve Avrupa'yı da içine alan kuzey yarım kürede en az 48 farklı balık türünde mevcut olduğu ortaya koyulmuştur (Skall ve ark., 2005).

VHSV, Türkiye'de ilk kez 2004 yılında Karadeniz Bölgesi'ndeki Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü (SÜMAE) tarafından üretilen 15 günlük kültüre kalkan yavrularından (*P. maxima*) izole edilmiştir (Kalaycı ve ark., 2006). Aynı yıl Antalya ilinde deniz levreklerinde (*D. labrax*) de VHS tespit edilmiştir. Gökkuşluğu alabalıklarından (*O. mykiss*) VHSV izolasyonu ise ilk kez 2006 yılında Bolu ili Mudurnu ilçesindeki bir çiftliğin yavru balıklardan yapılmıştır (Kalaycı ve ark., 2012).

2.2.2 Etiyolojisi

VHSV, Rhabdoviridae ailesinin Novirhabdovirus genusuna ait olup helikal nükleokapsid yapıda, tek iplikçikli RNA etrafında ribonükleikprotein ile, dışta lipoprotein yapısında bir zarftan oluşmaktadırlar. VHSV, 180 nm uzunluğunda, 60 nm çapında ve mermi şeklindedir (De Kinkelin ve Scherrer, 1970; McAllister, 1979). VHSV genomu yaklaşık olarak 11.200 nükleotid içerir ve 3'-N-P-M-G-Nv-L-5'

düzeninde kodlanmış N (nükleoprotein), P (polimerazla ilişkili fosfoprotein), M (matriks proteini), G (glikoprotein), L (RNA ya bağlı RNA polimeraz- Largoprotein) olmak üzere beş adet yapısal ve fonksiyonu tam olarak bilinmeyen yapısal olmayan bir adet NV (non-virion) geni olmak üzere toplam altı gene sahiptir (Schutze, 1999). G glikoproteini virüs zarfının en dışında yer almakta olup enfekte hayvanlarda nötralizan antikorların oluşumundan sorumludur (Biacchesi ve ark., 2002, Cupit ve ark., 2001, Nishizawa ve ark., 2002, Schutze ve ark., 1999). Matriks proteini (M) zarfın lipid tabakasının iç kısmında yer alırken nükleoprotein (N), viral RNA'nın etrafını sarmalamış olarak bulunmaktadır. Viral RNA'nın yanında serbest olarak bulunan Largoprotein (L) ise Matriksproteini (M1) (kofaktör) ile birlikte RNA-polimerazı oluşturmaktadır (Walker ve ark., 2000). NV geninin fonksiyonu net olarak anlaşılamamış olmakla birlikte patojeniteyle doğrudan ilişkili olduğu bildirilmiştir (Alonso ve ark., 2004; Biacchesi ve ark., 2000; Thoulouze ve ark., 2003).

VHSV izolatlarının N geni (Einer-Jensen ve ark., 2005; Snow ve ark., 1999; Snow ve ark., 2004), G geni (Einer-Jensen ve ark., 2004; Einer-Jensen ve ark., 2005) ve NV geni (Einer-Jensen ve ark., 2005) üzerine yapılan filogenetik analizlerde virüsün dört farklı genotipinin bulunduğu sonucuna varılmıştır (Nishizawa ve ark., 2006; Skall ve ark., 2004). Genotipler arası farklılığın virüsün izole edildiği yıl veya etkilediği türden daha ziyade coğrafi bölgeyle yakından ilişkili olduğu görülmüştür.

Genotip I: Avrupa tatlı su izolatları ve Baltık denizi izolatlarının bir kısmını içerir ve 5 alt gruba ayrılır.

a) Avrupa tatlı su balıkları izolatları

b) Baltık denizi, Skagerrak, Kattegat, İngiliz kanalı ve Kuzey denizi izolatlarının bir kısmı

c) Danimarka tatlı su izolatlarının bir kısmı

d) Norveç ve Finlandiya izolatları

e) Karadeniz izolatları

Genotip II: Baltık denizinde Gotland havzası izolatları

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

Genotip IV: Kuzey Amerika ve Asya (Kore ve Japonya) izolatlarını içermektedir (Einer-Jensen ve ark., 2004).

Ülkemizdeki gökkuşağı alabalıklarından (*O. mykiss*) ve kalkanlardan (*P. maxima*) izole edilen VHSV izolatları, Avrupa Birliği VHSV Referans Laboratuvarı *Danish Institute for Food and Veterinary Research* tarafından genotip 1b olarak tiplendirilmiştir (Kalaycı ve ark., 2006; Kalaycı ve ark., 2012).

Virüsün replikasyonu için optimum su sıcaklığı 14–15°C ve optimum pH 7,4–7,8 dir. Replikasyonun 6°C de çok azken 20°C de hiç olmadığı bildirilmiştir (Bernard ve ark., 1983; De Kinkelin ve ark., 1980; McAllister, 1990).

VHSV, diğer zarflı virüslerde olduğu gibi; eter, gliserol, formaldehit, kloroform, sodyum hipoklorit, sodyum hidroksit, iyodofor gibi dezenfektanlarla etkisiz hale getirilebilmektedir (McAllister, 1990).

2.2.3 Epidemiyolojisi

VHS hastalığı daha çok 4-14°C arasındaki su sıcaklıklarında görülmektedir. Hastalığın, su sıcaklığına bağlı olarak 7–15 günlük bir inkübasyon süresi vardır. Vestergard-Jorgensen (1982) gökkuşağı alabalıkları (*O. mykiss*) üzerinde yaptığı bir çalışmada enfeksiyonun oluşumu ile su sıcaklığı arasında ters bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, 10°C’de enfekte edilen alabalıklar daha sonra sırasıyla 5°C, 10°C, 15°C ve 20°C’deki sulara transfer edilmiştir. Hastalık, 5°C’de 14 hafta boyunca görülürken 10°C’de 2 hafta süresince gözlenmiştir. Hastalık 20°C’de ise tespit edilememiştir. Neukirch (1985) ise yaptığı araştırmada 4°C’deki gökkuşağı alabalıklarında (*O. mykiss*) enfeksiyonun 300-400. günlere kadar tespit edilebildiğini bildirmiştir. Hastalık her mevsiminde oluşmakla birlikte genellikle su sıcaklıklarının değişken olduğu ilkbahar aylarında görülmektedir (Acosta ve ark., 2005).

Stres, diğer viral hastalıklarda olduğu gibi VHS hastalığının çıkışında da önemli bir yere sahiptir. Virüsün, enfeksiyonu geçiren balıklarda latent faza geçebildiği ve herhangi bir stres faktörüyle beraber hastalık salgını ve/veya virüs saçılımının söz konusu olabileceği bildirilmiştir (Acosta ve ark., 2005; Heras ve ark., 2008; Skall ve ark., 2004; Snow ve ark., 2005).

Enfeksiyonun seyri balığın yaşıyla doğrudan ilişkilidir. Enfeksiyon her yaş grubunda görülebilirken genç balıkların yetişkin balıklara göre enfeksiyona daha duyarlı olduğu bilinmektedir. Çevre koşullarına bağlı olarak balık ölümleri %20-80 oranında görülürken alabalık larvalarında mortalitenin %100'e kadar çıkabildiği rapor edilmiştir (CFSPH, 2007). VHSV'nin tüm yaş gruplarına kolaylıkla bulaşabildiği ve hayatta kalan balıkların ömür boyu hastalığın taşıyıcısı konumuna gelerek genital sıvılar ve idrar yoluyla virüsü çevreye saçtıkları bilinmektedir. Virüs, genellikle sekonder solungaç lamelleri ve vücuttaki yaralar vasıtasıyla horizontal olarak balığa bulaşmaktadır. Yumurtlamadan 3-4 saat sonra yumurtalardan virüs izole edilmesine rağmen bu virüsün yumurta ile vertikal olarak bulaştığı henüz kanıtlanamamıştır (Gastric ve De Kinkelin, 1984; De Kinkelin ve Gastric, 1982; Jørgensen, 1980).

VHS salgınları hem deniz hem de tatlı su ortamında görülebilmektedir. Deniz kafeslerinde yetiştiriciliği yapılan gökkuşuğu alabalıklarının (*O. mykiss*) hastalığa daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Gastric ve de Kinkelin (1980) yaptıkları bir çalışmada alabalıkların tatlı sudan denize transferinden 80 gün sonra %85 mortalite oranı ile gözlenen bir salgın rapor etmiştir.

Hem tatlı su hem deniz ortamında virüsün taşıyıcısı olan doğal balık türleri üzerinde yapılan çalışmalarda bu balıkların kültür balıkları için bir enfeksiyon kaynağı olabileceği sonucuna varılmıştır. Aynı şekilde, doğal balık türleri de enfekte olmuş kültür balıklarından yayılan virüslere karşı hassastır. Doğal balıklar ile kültür balıkları arasındaki bu çift yönlü virüs transferi virüsün doğada varlığını sürdürebilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Enzmann ve Konrad, 1985; Jørgensen, 1982; Meier ve ark., 1994).

VHSV'nin Great Lakes Lawrence (ABD) nehir sistemine girişi ve yayılımı üzerine yapılan çalışmalar bu virüsün, göçmen balıklar (Elsayed ve ark., 2006), yetiştiricilik aktiviteleri (Skall ve ark., 2005; FRS, 2006), balık yemleri (Goodwin ve ark., 2004) ve su kuşları vasıtasıyla (Peters ve Neukirch, 1986) nehir sistemine girmiş ve yayılmış olabileceğini göstermektedir.

Olta balıkçılığı için doğadan elde edilmiş yem amaçlı kullanılan balıklar canlı veya donmuş olarak sağlık durumlarına bakılmaksızın ticari amaçla alınıp satılmakta ve yeni bölgelere taşınmaktadır. Bu yemler, virüsün endemik olduğu bir bölgeden yeni bir bölgeye taşınmasında önemli bir yere sahiptir (Goodwin ve ark., 2004). Yem olarak kullanılan dondurulmuş Pasifik ringa (*Clupea harengus pallasii*) balıklarından izole edilmiş VHSV, bu balıklar iki kez dondurulup çözündürüldükten sonra bile hücre kültüründen izole edilebilmiştir (Meyers ve ark., 1994). Bu da yetiştiricilikte kullanılan yemlerin hastalığın yayılmasında önemli bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır.

Kuluçkahane atık sularının deşarj edildiği yerlerdeki materyallerden VHSV'nin izole edilmesi ve hatta bu virüsün su içerisinde birkaç gün canlı kalabilmesi kuluçkahanelerin virüsün yayılmasında önemli bir rol oynadığının kanıtıdır (de Kinkelin ve Scherrer, 1970).

Stres, birçok hastalıkta olduğu gibi VHS hastalığının epizootiğinde de önemli rol oynamaktadır. Özellikle yüksek stok yoğunluğu, kötü beslenme, yetiştiricilik faaliyetleri, balık transferi vs. gibi durumlara maruz kalan balıklarda VHSV'nin yoğunluğu ve hastalığın şiddeti artabilmektedir. Bunun yanısıra optimum yetiştiricilik şartlarında çok az balığın hastalık belirtilerini gösterdiği bildirilmiştir (Jørgensen, 1974; Hershberger ve ark., 1999).

VHS hastalığında deneysel enfeksiyon; banyo yoluyla virüse maruz bırakılarak, intraperitoneal ve intramuskuler enjeksiyonla, solungaçlara virüsün sürülmesiyle, kohabitasyon yöntemiyle veya virüsün oral yolla verilmesi ile gerçekleştirilebilmektedir (Ahne, 1985; de Kinkelin ve Gastric, 1982; Gastric ve de Kinkelin, 1984).

VHSV, Kuzey Amerika Pasifik bölgesinden 18, Kuzey Amerika Atlantik bölgesinden 3, Japonya'dan 2 ve Kuzey Avrupa'dan 15 balık türünden izole edilmiştir. Ayrıca, yetiştiriciliği yapılan 5 deniz balığı ve 7 tatlısu balığı türünden de izole edildiği bildirilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda 11 balık türünün bu virüse duyarlı olduğu bildirilirken, sazan balıklarının duyarlı olmadığı rapor edilmiştir (de

Kinkelin ve Gastric, 1982; López-Vazques ve ark., 2002). Ayrıca birçok deniz balığı türünün de taşıyıcı olduğu bildirilmiştir (Meyers ve ark., 1994).

VHSV, Türkiye’de ilk kez 2004 yılında Karadeniz’deki Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü (SÜMAE) tarafından üretilen 15 günlük kültüre kalkan yavrularından (*P. maxima*) izole edilmiştir (Kalaycı ve ark., 2006). Salgın, bahar aylarında su sıcaklığının dalgalandığı dönemde patlak vermiş ve 15-20 günlük yavrularda %99 ölümle seyretmiştir (Kalaycı ve ark., 2006). Aynı yıl Antalya ilinde deniz levreklerinde (*D. labrax*) de VHSV tespit edilmiş, bu işletmeye Trabzon’da VHSV tespit edilen tesisten kalkan (*P. maxima*) girişi olduğu öğrenilmiş ve levreklerle (*D. labrax*) de bu yolla bulaştığı düşünülmüştür. Muğla ilinde bulunan levreklerden (*D. labrax*) teşhis amaçlı yapılan örneklemelerde VHSV tespit edilmiştir. Bu işletmelere de bölgeye getirilen kalkan balıklardan (*P. maxima*) bulaşma olabileceği düşünülmektedir. Gerek Antalya gerekse Muğla illerinde VHSV tespit edilen işletmelerdeki levreklerde (*D. labrax*) ölüm görülmemiş ve iki yıllık izleme programında da tekrar virüs izole edilememiştir. İzmir ilindeki bir işletmede levrek (*D. labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) balıklarında VHSV tespit edilmiş ve bulaşmanın doğal balıklardan olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca 2006 yılında da Karadeniz’de doğal kalkan (*P. maxima*) balıklarından VHS virüsünün izole edilmiş olduğu bildirilmiştir (Işidan ve ark., 2011).

Gökkuşığı alabalıklardan (*O. mykiss*) ilk VHSV izolasyonu ise 2006 yılında Bolu ili Mudurnu ilçesindeki bir çiftliğin yavru balıklardan yapılmıştır (Kalaycı ve ark., 2012). Salgının 10-11°C su sıcaklığında görüldüğü ve %90 ölümle seyrettiği bildirilmiştir. 2007 yılında bu işletme ile yem alışverişi yapan Bolu ilindeki bir başka işletmede de VHSV tespit edilmiştir (Kalaycı ve ark., 2012).

2.2.4 Klinik Belirtileri

VHS hastalığına karşı en hassas türün gökkuşığı alabalıkları (*O. mykiss*) olduğu bilinmektedir. Hastalığın en tipik belirtileri kaslarda, sindirim organlarında ve gözlerde hemoraji, ekzoftalmus, renkte kararma ve anemiye bağlı solungaçlarda görülen solgunluktur. Ekzoftalmus bir ya da iki gözde olabilir ve göz orbitası etrafında hemorajiler gözlenebilir. Hasta balıklar yavaş yüzer ve letarjiktir. Salmonid

ya da yassı balıkların tümünde iç organlarda, karaciğerin üstünde, adipöz dokuda özellikle de kasların içinde geniş hemorajilerin görülmesi yaygın bir özelliktir. Hasta balıklar düzensiz yüzerler ya da belirli bir yöne yönelmeleri zor olur ve havuzun kenarlarında bir arada dururlar (Isshiki ve ark., 2001; Skall ve ark., 2004). VHS hastalığı, akut, kronik ve latent (taşıyıcı) olmak üzere 3 farklı formda görülebilir (Wolf, 1988; Yasutake, 1970).

Akut tipte, tipik olarak ani ve yoğun ölümler görülür. Balıklarda uyuşukluk, renkte koyulaşma, ekzoftalmus ve kansızlık görülebilir. Gözlerde, deride, solungaçlarda ve çoğunlukla pektoral ve pelvik yüzgeç diplerinde kanamalar görülür.

Hematolojik incelemede kan total proteininde azalma olurken Ig fraksiyonlarının arttığı görülür. Düşük hematokrit ve düşük hemoglobin seviyesi şiddetli anemi olduğuna işaret eder. Akut dönemde lökopeni gözlenir (normal lökosit miktarı 10.000-15.000 arasındadır) (Çağırğan ve ark., 1996).

Subakut veya kronik evrede balıklarda yoğun ölümler görülür fakat ölümler akut tipe göre daha uzun zamana yayılmıştır. Balıklarda uyuşukluk, renkte koyulaşma, ekzoftalmus ve şiddetli anemi görülebilir. Hemoraji de görülebilir fakat şiddetli değildir. Karaciğer, dalak ve böbreğin ödemeine bağlı olarak karın şişkindir. Karaciğer soluk ve petek şeklinde kızarıklıklar vardır. Latent enfeksiyonda ölüm düşüktür ve balık normal görünümlü fakat hiperaktif olabilir (McAllister, 1990). Kanda immature eritrosit sayısı artmıştır (normalde 1.8-2 milyon arasındadır) (Çağırğan ve ark., 1996). Bunların dışında bir de nervöz evre tanımlanmıştır. Bu dönemde asites azalırken solungaçlar eski rengine dönmeye başlar ve VHS hastalığına ait belirtiler kaybolur. Bunlara ilave olarak balıklarda sinirsel semptomlar ve yüzme bozuklukları baş gösterir (Çağırğan ve ark., 1996). Sinirsel formunda kuyruğunu takip etme ve spiral dönme gibi anormal yüzme hareketleri belirgindir. Rhabdovirüslerin sinir sistemine oldukça belirgin bir yönelim gösterdikleri bilinmektedir. Deneysel olarak enfekte edilmiş gökkuşuğu alabalıklarında (*O. mykiss*) hastalığın sinirsel formunda beyinden yapılan izolasyonda virüsün 1×10^9 TCID₅₀ g⁻¹ titreye ulaşabildiği bildirilmiştir (Smail, yayınlanmamış gözlemler).

2.2.5 Patolojisi

İç bakıda göz çevresinde, iskelet kaslarında ve iç organlarda peteşiyel kanamalar görülebilir. Karaciğerde yer yer renk farklılaşmaları ile birlikte şişkinlik ve kan toplanması vardır. Böbrekler kırmızı renkte ve incelmıştır. En çok değişiklikler böbrek ve karaciğerde meydana gelmektedir. Hastalığın erken aşamalarında böbrek şişer ve koyu kırmızı renk alır fakat alabalık larvaları ve parmak boylarında böbreğin baş ve orta kısmı genellikle tamamen nekroze olur ve solgunlaşır. Karaciğer normalden daha solgun, hemorajik alanlarla birlikte alacalı sarımsı bir renk almıştır. Oküler dokuda, deride, barsak submukozasında, kaslarda ve visserada hemorajiler meydana gelmesi sistemik kanamaya işaret etmektedir. Gastrointestinal kanalda gıda yoktur ve lümeninde uzayan bir mukus görülebilmektedir. VHS hastalığı nedeniyle oluşan histopatolojik değişiklikler genellikle karaciğer, böbrek, dalak ve iskelet kaslarında görülür (Amlacher ve ark., 1980; Ghittino, 1965; Wolf, 1988; Yasutake, 1970). Böbrekler, dalak ve karaciğerde ödem, nekrotik odaklar, hemorajiler ve yangı hücresi infiltrasyonları gözlenmektedir (Isshiki ve ark., 2001). Akut olarak etkilenen balıklarda karaciğer sinüzoitleri kan ile doludur, hepatositlerde fokal veya yaygın nekrotik değişiklikler, sitoplazmik vakuoller, piknozis, karyolizis ve lenfosit infiltrasyonu görülebilir. Benzer değişiklikler böbrek ve dalakta da görülebilir. İskelet kaslarında eritrosit yığılmalarına rastlanır fakat dokularda çok az hasar meydana gelir. (Skall ve ark., 2005). Kronik olarak enfekte olmuş balıklarda karaciğer sinüzoitleri genişlemiştir ve pıhtılaşmış plazma içerir. Böbrek ve dalak gibi hematopoietik dokular ile mononükleer lenf hücreleri hiperplastiktir. Taşıyıcı olan balıklarda hiçbir belirti görülmediği gibi histopatolojik değişiklikler de saptanamayabilir (McAllister, 1990; Wolf, 1988).

VHSV, böbrekte oldukça patojendir, ekskretorik tubullerden ziyade hematopoietik dokuda nekroz, hastalığın önemli özelliğidir. Baş böbreğe yüksek yoğunlukta yayılmış olan melanomakrofajlar granüllerin salınmasıyla lizise neden olur ve nekroz ile sonuçlanır. VHSV önemli bir lökotropizme sahiptir (Knott ve Munro, 1986).

Gökkuşığı alabalıklarının (*O. mykiss*) karaciğerlerinde yaygın fokal nekrozlar, hepatosit dejenerasyonu, kromatin granülasyonu ve tubular lumene hilayın materyalinin birikmesi gözlenir. Turna balığı (*Esox lucius*) yavruları gibi diğer konaklarda, ekstrasvazasyon (damar dışına çıkma) ya da kan sızması, kaslarda kanın birikmesi ve pankreatik nekroz oluşabilir (Meier ve Vestergard-Jorgensen, 1980). Kalp, hedef organlardan bir diğeridir. Salmonidlerde kalp patolojisi tanımlanmamışken, Gigha adasındaki VHS salgınında kalkanlarda ventriküler fibrillerde belirgin nekrozlar olduğu bildirilmiştir.

2.2.6 Patogenezi

Rhabdovirüsler zarflarında bulunan glikoproteinlerle konakçı hücreye tutunup endositoz yoluyla sitoplazmaya girerler. Yapılan bir deneysel enfeksiyon çalışmasında immersiyon yoluyla verilen VHSV, 24 saat sonra solungaçlarda, 48 saatin sonunda böbrek, dalak ve deride, üçüncü gün ise tüm dokularda tespit edilmiştir. Çalışmanın dördüncü haftasında solungaç, kalp, beyin ve kan hariç diğer dokularda VHSV tespit edilememiştir. Altıncı haftaya gelindiğinde ise yalnızca kalp ve beyinde virüs varlığı belirlenmiş olup yedinci haftada hiçbir dokuda VHSV tespit edilememiştir. Bu çalışmada enfeksiyonu geçirip hayatta kalan balıklar çeşitli stres faktörlerine maruz bırakıldığında bu balıkların kalplerinden yeniden VHSV izolasyonu yapılabilmektedir (Amlacher ve ark., 1980; Wolf, 1988; Yasutake, 1970).

2.2.7 Teşhisi

VHSV'nin standart teşhisi virüsün hücre kültüründen izole edilmesiyle yapılır. VHSV, organ homojenizatları, genital sıvılar ve idrardan izole edilebilir. Ön böbrek ve dalakta, karaciğer ve kalp kasındakinden daha fazla virüs bulunduğu tespit edilmiştir. Taşıyıcı balıkların muayenesinde beyinden mutlaka örnekleme yapılması gerektiği bildirilmektedir (Çağırğan ve ark., 1996).

VHSV; BF-2, CHSE- 214, EPC, Fathead Minnow (FHM), RTG-2 gibi çeşitli balık hücre hatları ile levrek (*D. labrax*) ve sazangillerin yumurtalarında çoğaltılabilir (McAllister, 1979). VHSV'nin hücre kültüründe replikasyonu için optimum sıcaklık 14–15°C'dir (de Kinkelin, 1970). Primer izolasyonda dokunun

%7'lik PEG (Polyethylene Glycol) veya DEAE (Diethylaminoethyl) dextran ile muamelesi izolasyon şansını artırır (Batts ve Winston; 1989). VHSV'nin, virüs nötralizasyon testi sonuçlarına göre 3 serotipinin olduğu bilinmektedir. Bunlar F1, F2 ve 23.75 'tir (Le Berre ve ark., 1977). Viral antijenin doku kültüründe varlığı IFAT (*Indirect Fluorescent Antibody Test*), immunoperoksidaz (Fasial ve Ahne, 1980), immunoblot, ELISA (McAllister ve Owens, 1987) metodlarıyla ortaya koyulabilir. Serotipler arasında IFAT ve nötralizasyon testlerinde çapraz reaksiyon olduğu bildirilmiştir (Jorgensen, 1980). Yapılan bir çalışmada iki aşamalı (Nested) RT-PCR metodunun, virüs izolasyonu metodu ve southern blot analizine göre daha duyarlı bulunmuştur (Vázquez ve ark., 2006).

2.2.8 Kontrolü ve Tedavisi

VHS hastalığının henüz bilinen bir tedavisi yoktur ve virüs ile konakçı arasındaki temasın önlenmesi hastalığın kontrolündeki en etkili yöntemdir (Ghittino, 1965). Hücre ortamı dışında eter, gliserol, formaldehit, kloroform, sodyum hipoklorit, sodyum hidroksit, iyodofor gibi dezenfektanlarla etkisiz hale getirilebilirler (McAllister, 1990). Virüsün pH 3.5'te inaktive olduğu, pH 5.0-10.4 arasında ise stabil kaldığı bildirilmiştir (Çağırğan ve ark., 1996).

Kuluçkahane dezenfeksiyonu ve bununla birlikte patojen içermediği bilinen yumurta veya balıklarla yeniden stok oluşturma hastalığın önlenmesindeki en başarılı yöntemlerdir (Kehlet, 1973; Jørgensen, 1974). Yumurtaların iyodofor ile dezenfeksiyonu hastalığın önlenmesi için iyi bir yoldur (Çağırğan ve ark., 1996). Kuluçkahane giriş suyunun kontrolü hastalık etkeni olan mikroorganizmaların kuluçkahaneye girişini minimuma indirmede önemli rol oynamaktadır. Bu kontrolü sağlamak için birçok yöntem kullanılabilir fakat kısa dalga boylu ultraviyole ışınları gerek tek başına gerekse diğer dezenfektanlarla birlikte en çok kullanılan yöntemdir. Ultraviyole ışınları dalga boylarına göre UVA (320–400 nm), UVB (280–320 nm) ve UVC (200–280 nm) olmak üzere 3'e ayrılırken, bunlardan en yüksek antiseptik etkiye UVC sahiptir. UVC kullanımının şimdiye kadar bilinen bir yan etkisi yoktur ve bakteri ve virüslerin inaktivasyonunda oldukça etkili bir yöntemdir (Kurth ve ark., 1999). Temel olarak UVC, aralarında VHSV'nin de bulunduğu bazı RNA virüslerinde genomlarda kırılmalara ya da mutasyona neden olarak urasil ünitelerinin

dimerizasyonuna yol açarak virüslerin inaktivasyonunu sağlar (Smirnov ve ark., 1991).

Su sıcaklığında yapılan değişikliklerle VHSV etkisiz hale getirilebilir (Roberts, 2001). Sıcaklık değişimlerinin yanı sıra pH'nın <2,5 ve >12,2 değerlerinde olması da VHSV'yi etkisiz hale getirmektedir (CFSPH, 2007). Virüs belirlenen kaynaklardaki tüm yumurtaların imha edilmesi, şüpheli ve enfekte kaynaklardan balık, yumurta alınmaması, yetiştiricilikten kaynaklanan stresin azaltılması, sıkı kontrol politikaları ve hijyen tedbirlerinin uygulanması viral hastalıklarla mücadelede önemlidir.

Hastalığa karşı attenüe aşı geliştirilmiştir fakat virüsün tekrardan virülens kazanarak enfeksiyona yol açma riskinden dolayı kullanımına izin verilmemektedir. Klonlanmış subunit aşular üzerinde olumlu sonuçların alındığını bildiren araştırmalar vardır (Çağırğan ve ark., 1996).

Bazı balıklarda hastalıklara karşı doğal direnç bakımından farklılıklar olduğu bilinmektedir. Genetik ıslah çalışmalarıyla özellikle viral hastalıklara dirençli soyların yetiştirilmesinin, hastalıkların koruma ve kontrolünde önemli olduğu bildirilmektedir (Henryon ve ark., 2002; Quillet ve ark., 2007; Slierendrecht ve ark., 2001).

Etanol, 1-propanol, fenol, kresol, sodyum hipoklorit, sönmemiş kireç, iyodin gibi çeşitli dezenfektanların VHSV üzerine virüsidal etkileri olduğu bildirilmiştir (Kurita ve ark., 2002).

2.3 İnfeksiyöz Hematopietik Nekrozis

2.3.1 Tarihçesi

İnfeksiyöz Hematopietik Nekrozis (IHN) çoğunlukla gökkuşacağı alabalığı (*O. mykiss*), kırmızı somon (*Oncorhynchus nerka*) ve kral somon (*Oncorhynchus tshawytscha*) yavrularında görülen akut, sistemik, viral bir hastalıktır (Rucker ve ark., 1953). Hastalığa, McAllister ve arkadaşları (1974) tarafından Rhabdoviridae ailesindeki Novirhabdovirüs'ün neden olduğu rapor edilmiştir. Hastalık, ilk olarak

Washington eyaletindeki bir kırmızı somon (*O. nerka*) çiftliğinde ortaya çıkmıştır (Rucker ve ark., 1953). Avrupa'da ise ilk olarak 1987 yılında Fransa'da (Baudin, 1987), daha sonra 1987 yılında İtalya'da (Bovo ve ark., 1987) ve 1992 yılında Almanya'da (Enzmann ve ark., 1992) ortaya çıkmıştır.

2.3.2 Etiyolojisi

IHNV; kurşun şeklinde, segmentsiz, tek iplikçikli RNA genomuna sahip bir virüstür. Genomunda 6 proteini kodlayan yaklaşık 11000 nükleotit bulunmaktadır. Bu proteinler nükleoprotein (N), fosfoprotein (P), matriks proteini (M), glikoprotein (G), non-virion protein (NV) ve polimeraz (L) proteindir. Yapısında bulunan NV (non-virion) geni Novirhabdovirüs cinsi içerisinde bulunan virüslere özgü bir proteindir. IHNV'nin Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonunda ATCC VR-1392 kodlu bir suşu bulunmaktadır (Winton ve Einer-Jensen, 2002). Yapılan çalışmalarda Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya'dan izole edilen IHNV'lerin sekansları karşılaştırılmış ve Pasifik somonlardan izole edilen IHNV'nin elde edildikleri coğrafik bölgeyle ilişkili 2 genogrubu olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark., 2007; Kurath ve ark., 2003; Nishizawa ve ark., 2006; Troyer ve Kurath, 2003). Bu iki genogrup arasında çok düşük nükleotid farklılıkları olduğu bilinmektedir. Bunların yanısıra Amerika'daki gökkuşağı alabalıklarından (*O. mykiss*) izole edilen IHNV suşlarının 3. bir genogrup içerisinde olduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak Avrupa ve Asya'daki gökkuşağı alabalıklarından (*O. mykiss*) izole edilen IHNV'lerin Kuzey Amerika orijinli olduğu fakat genetik olarak farklı olduğu rapor edilmiştir (Enzmann ve ark., 1992; Kim ve ark., 2007; Nishizawa ve ark., 2006).

Nötralizan poliklonal tavşan antiserumları ile yapılan antijenik çalışmalarda IHNV'nin tek bir serogrubu olduğu görülmüştür (Engelking ve ark., 1991). Fare monoklonal antikoları ile yapılan bir çalışmada ise virüs glikoproteininde nötralize olan birçok epitop olduğu belirlenmiştir (Huang ve ark., 1994; Ristow ve Arnzen de Avila, 1991; Winton ve ark., 1988).

IHNV; ısıya, asite ve etere duyarlıdır. Genel dezenfektanlar ve kurutma ile inaktive edilebilir ve tatlı suda en az 1 ay canlı kalabilir (Wolf, 1988). Virüs; idrar, genital sıvılar ve eksternal mukus ile etrafa saçılır (Bootland ve Leong, 1999; Wolf,

1988). Doğal koşullarda hastalık, su sıcaklığının 8-15°C arasında olduğu dönemlerde görülür (OIE, 2016). Yapılan deneysel çalışmalarda ise virüsün 3-18°C arasında mortaliteye neden olduğu görülmüştür (Bootland ve Leong, 1999).

Virüsün solungaçlar aracılığıyla vücuda girdiği ve yerleşmek için en çok ön böbrek ve dalağı tercih ettiği görülmüştür (Bootland ve Leong, 1999; Wolf, 1988). IHNV'nin direkt kontakt yoluyla horizontal olarak bulaştığı fakat bazı omurgasız vektörlerin de bulaşmada rol alabileceği bildirilmiştir. Akut salgınlarda mortalitenin %90-95'e varabileceği rapor edilmiştir (Bootland ve Leong, 1999).

2.3.3 Epizootiyolojisi

IHN, Amerika ve Kanada'da hem kültüre edilmiş hem de doğal salmonidlerde yaygın görülen bir hastalıktır. Hastalık dünyanın her yerindeki kırmızı somonlarda (*O. nerka*) görülmektedir (Amend ve Wood, 1972; Grischkowsky ve Amend, 1976; Williams ve Amend, 1976). Enfekte ergin somonlar, IHNV'yi yumurta, ovaryum ve seminal sıvılar ile etrafa yayarlar (Amend, 1975; Mulcahy, 1981). Bulaşmanın başlıca yumurta yoluyla olduğu bilinirken Guenther ve arkadaşlarının 1959 yılında yaptığı çalışmada hastalığın somonların iç organlarından hazırlanmış çiğ yemler ile de bulaşabileceği rapor edilmiştir. Amend ve arkadaşları 1975 yılında hastalığın virüsle enfekte hücre hatlarının, duyarlı balıkların bulunduğu havuzlara ilave edilmesiyle bulaşabildiğini bildirmiştir.

Hetric ve ark. (1979) gökkuşağı alabalıklarının (*O. mykiss*), 15-18°C'deki su sıcaklığında IHNV ile enfekte olduğunu göstermişlerdir. Gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) parmak boylarında yapılan deneysel çalışmalarda hastalığın inkübasyon periyodunun su sıcaklığı ile ilişkili olduğu görülmüştür. Hetric ve ark. (1979) virüsün verilmesinden ölümün gerçekleşmesine kadar olan sürelerin; 21°C'de 5 gün, 3°C'de 15 gün olduğunu rapor etmiştir. IHN hastalığında klinik belirtilerin yumurtadan çıktıktan 21-35 gün sonra ortaya çıktığı görülmüştür (Çağırğan ve ark., 1996). Mortalitenin en çok 3 hafta ile 6 aylık dönemde olduğu bildirilmiştir (Wolf, 1988; McAllister, 1993). Epizootilerin oluşması için optimum su sıcaklığının 12-15°C olduğu rapor edilmiştir. Bu sıcaklık aralığında yüksek mortalite meydana geldiği, düşük sıcaklıklarda kümülatif mortalite daha fazla olmasına rağmen

epizootinin sönüş süresinin uzun olduğu bildirilmiştir (Hetrick ve ark., 1979). Epizootiden sağ kalanların latent olarak virüsü taşıdığı belirtilmiş, stres ortamında ve üreme döneminde enfeksiyonun patlak verdiği görülmüştür (McAllister, 1993).

IHNV'nin taşıyıcı balıklarda yalnızca yumurtlama döneminde ve epizootiler süresince belirlenebileceği öne sürülmüştür (Amend, 1975). IHNV taşıyıcılarını belirlemek için en iyi yolun tekrarlanan gözlemleri takiben yapılacak virolojik örneklemeler olduğu bildirilmiştir. Fakat çok dikkatli takip edilen ve gözlenen populasyonlarda dahi hastalığın beklenmedik şekilde ortaya çıkabileceği belirtilmiştir (Mulcahy, 1981).

Hastalık, 1983 yılında Busch tarafında 100-500 g ağırlığındaki gökkuşağı alabalıklarında (*O. mykiss*) da rapor edilmiştir (Caswell-Reno ve Lipipun, 1989). Yapılan çalışmalarda hastalığın hematopoietik formunda en yüksek virüs konsantrasyonunun böbrek ve dalak dokusunda, nörotropik formunda ise beyin dokusunda olduğu bildirilmiştir (Hsu ve ark., 1989).

2.3.4 Klinik Belirtileri

IHN enfeksiyonu genellikle aniden ortaya çıkıp ölümle sonuçlanır fakat enfeksiyonun süresi ve epizootilerin ortaya çıkışı konakçı türüne bağlıdır. Hastalığa bağlı ölümler, gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*), kırmızı somon (*O. nerka*) ve kral somon (*O. tshawytscha*) yavrularında besin kesesinin olduğu dönemden bir yaşına gelene kadarki sürede görülür. Kırmızı somon (*O. nerka*) yavrularında görülen IHN enfeksiyonunda ilk belirtilerin ortaya çıkmasıyla ölüm arasında yalnızca birkaç saat vardır. Gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) ve kral somon (*O. tshawytscha*) yavrularında ise bu süre birkaç güne kadar çıkabilir.

Hastalığın dış belirtilerinde renkte kararma, letarji, suda dönerek yüzme ve akut ölümler görülür. Enfekte balıklar genelde koyu renkli ve ekzoftalmiktir. Durgun sularda gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) parmak boylarının anüsünden uzanan opak, kirli beyaz renkte dışkı kalıntıları gözlemlenebilir. Pektoral, pelvik ve ventral yüzgeç diplerindeki hemorajiler çoğunlukla kaslarda ve ağızda da görülür. Dorsal yüzgeç ile kafa arasında subdermal hemorajiler olabilir (Çağırğan ve ark., 1996). Abdominal

şişkinlik ve solungaçlarda solgunluk da en sık görülen belirtilerendir. Balıklar genellikle anemiktir ve hastalığı atlatanların %1-5'inde lordozis ve skolyozis oluşmaktadır (Yasutake, 1970).

Hastalığın iç belirtilerinde böbreklerin sıklıkla yarı saydam ve pigment hücreleri tarafından oluşturulmuş beneklerle kaplı olduğu, diğer organların ise genellikle normalden daha solgun görüldüğü bildirilmektedir. Bunların yanında dalağın kiraz kırmızısı rengini aldığı görülür. Yavru balıklarda böbrek, dalak, karaciğer, pankreas ve sindirim sistemindeki patolojik belirtiler belirgindir. Böbreğin hematopoietik dokularında şiddetli nekrozlar görülür. Pankreasın asiner ve endokrin hücrelerinde intrasitoplazmik ve intranükleer inklüzyonlar, karaciğerde fokal nekrotik değişiklikler, bağırsakların lamina propiyasının granüler hücreleri, stratum kompaktum ve stratum granulozumda patolojik değişiklikler görülür. Bu değişikliklerin daha çok 3-4 aylık balıklarda görüldüğü, daha küçük balıklarda ise görülme ihtimalinin düşük olduğu bildirilmiştir (Çağırğan ve ark., 1996). Bunların yanısıra vücut boşluğunda berrak, sarı renkli bir sıvı birikimi olduğu bildirilmiştir. Dejenere olmuş dokularda çok sayıda lenfosit, polimorf nükleer lökosit, hiperemi, peteşi ve hemoraji görülürken eritrositlerin çizgili kaslarda akümüle olduğu fakat kaslarda nekrozların görülmediği bildirilmiştir (Yasutake, 1970).

2.3.5 Teşhisi

IHN salgınları sırasında generalize viremi şekillendiğinden bu dönemde neredeyse tüm dokulardan virüs tespit edilebildiği bildirilmiştir (Amend, 1975). Virüs, akut enfeksiyonlardan ve üreme dönemindeki taşıyıcı balıkların genital sıvılarından da izole edilebilir (Çağırğan ve ark., 1996). Virüs izolasyonu için en önemli materyallerin dalak, ön böbrek, kalp ve beyin olduğu bilinmektedir. Bazı durumlarda ovaryum sıvısı ve spremin de incelenmesi gerekebilmektedir. IHNV, enzimatik reaksiyonlara karşı çok duyarlı olduğu için örneklemede karaciğerin alınmamasına dikkat edilmelidir (OIE, 2016). Virüsün identifikasyonu için anti-IHNV serumu ile nötralizasyon testi yapılmalıdır. (Amend, 1975). Mulcahy ve Fryer tarafından 1976'da yapılan bir çalışmada gökkuşağı alabalıklarında (*O. mykiss*) hem IHNV hem de IPNV tespit edilmiştir. Bu nedenle teşhiste diğer virüslerin varlığı da araştırılmalıdır. İzolasyonun solungaç, dalak ve pilorik sekadan da yapılabileceği

fakat diğerk organlardan izolasyon şansının düşük olduğu bildirilmiştir (Dixon ve Hill, 1983). Örnek olarak gelen marazi maddeler 4°C’de en iyi şekilde muhafaza edildikten sonra 24 saat içerisinde duyarlı hücre hatlarına ekimleri yapılmalıdır (Çağırğan ve ark., 1996). IHNV’ye en duyarlı hücre hatlarının CHSE-214, EPC, FHM, RTG-2 gibi balık hücre hatları olduğu bildirilmiştir (McAllister, 1993; Wolf, 1988). Hücre kültüründe virüsün replikasyonu 20°C’de gerçekleşebilse de optimum replikasyon sıcaklığının 10-15°C’ler arasında olduğu bildirilmiştir (Wolf, 1988). Virüsün dokudan izolasyonunda marazi maddenin polietilen glikol ile muamele edilmesi izolasyonun duyarlılığını artırdığı rapor edilmiştir (Batts ve Winton, 1989). IHNV; virüs nötralizasyon, FAT (La Patra ve ark., 1989), ELISA (Dixon ve Hill, 1983), immunoblot (Schultz ve ark., 1989) metodları ile identifiye edilebilirken immunofloresan ve immunohistokimyasal teknikler ile kandan ve böbrekten hazırlanan preparatlardan da teşhisin mümkün olduğu bildirilmiştir (Dixon ve Hill, 1983).

Miller ve ark. (1998) IHN’nin tanısında, virüsün hücre kültüründe izolasyonunu takiben yapılan identifikasyon metodlarının direkt doku örneklerinden yapılan RT-PCR’den çok daha az duyarlı olduğunu bildirmiştir.

2.3.6 Koruma ve Kontrolü

Hastalığın önlenmesinde izlenecek en önemli adım IHNV ile enfekte yumurta ve balıkların çiftliğe girişinin önlenmesidir. Eğer yumurtalar hastalığın görüldüğü yerlerden temin edilecekse transferden önce ve sonra organik iyodin ile dezenfekte edilmelidir (Amend ve Pietsch, 1972). Kullanılacak organik iyodin solüsyonunun pH 6 veya daha yüksek bir değerde, 100 ppm derişiminde, en az 10 dakika süreyle uygulanması önerilmektedir (Amend, 1974). Organik iyodin dezenfeksiyonu virüs transferinin önlenmesinde kesin çözüm değildir. IHNV; eter, kloroform, formol, gliserin, ozon, hipoklorit, iyodofor, gamma ve UV ışınları ile inaktive olur (Wedemeyer, 1978; Wedemeyer, 1979). Virüs, pH 4’ün altında ve pH 10’un üzerinde, 60°C’de 15 dakikada inaktive olur. Yapılan araştırmalarda 17°C’nin üzerinde enfeksiyonun patlak vermediği bildirilmişse de bu sıcaklıkta portörlük şekillenebilir (Amend, 1970; Amend ve ark., 1973). 6-thioinosine veya 1-B-D-

Ribofuuranosyl 5-hidroksi uranil ile tedavi ölümleri azaltsa da tamamen durdurmak mümkün değildir (Hasobe ve Saneyoshi, 1985).

Korumada özellikle 14°C'nin altındaki su sıcaklıklarında havuzların kontrolü çok önemlidir. IHNV, genç balık popülasyonunda %90'dan fazla ölüme neden olabilir. 1970-1980 yılları arasında hem kültüre edilmiş hem de doğal alabalık ve somon yavrularında 100 milyondan fazla ölüme neden olduğu bildirilmiştir (Mulcahy, 1981). Patojen, balıktan balığa geçtiği gibi anaç balıklardan yavrulara seminal sıvılar veya enfekte yumurtalar aracılığı ile de geçebilir (Amend ve ark., 1969; Wolf ve ark., 1973). Asemptomatik ergin taşıyıcılar viral partikülleri yumurtlama sırasında etrafa saçarlar (Amend, 1975). Kral somon (*O. tshawytscha*) balıklarındaki kayıpları önlemek için yapılan sıcaklık değişimleri, sıcaklığa dirençli virüs suşlarının ortaya çıkması, yüksek enerji giderleri ve IHN hastalığı sonrası oluşan taşıyıcılar nedeniyle tavsiye edilmemektedir (Amend, 1974). Yumurta inkübatörlerinde çok fazla yumurta veya yavru bulunmasının salgınların şiddetini artıran önemli bir faktör olduğu bilinmektedir. Suyun tekrar kullanılması, balıkların elle yakalanması ve diğer stres oluşturan durumlar ergin balıklarda hastalığın ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Amend ve Pietsch, 1972). Gökkuşuğu alabalığı (*O. mykiss*), gibi soğuk su balıkları etkili bir şekilde dezenfekte edilirse ve enfekte olmayan su kaynakları tarafından beslenirse IHN kontrolü rahatlıkla sağlanabilir.

2.3.7 Aşılması

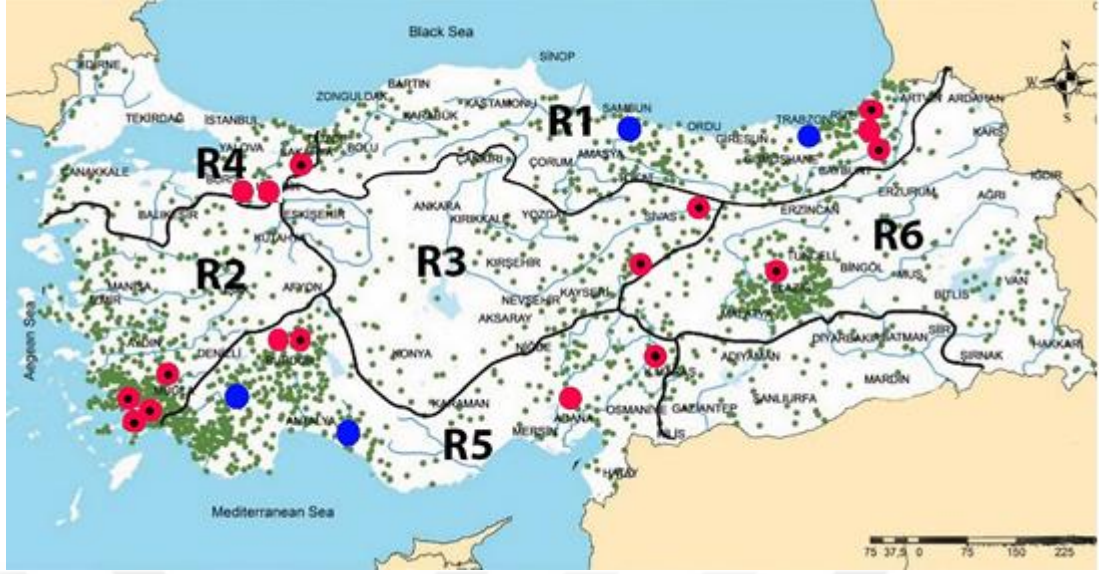
IHNV'ye karşı aşı geliştirme çalışmaları hem laboratuarda hem de saha çalışmalarında denenmiştir (Kurath, 2008; Winton, 1991; Winton, 1997). Güçlü etkisi ve uzun süreli koruma sağlaması nedeniyle ilk lisanslı DNA aşısı 2005 yılında Kanada'da IHNV'ye karşı hazırlanmıştır (Appex-IHN, Aqua Health Ltd.). Kuzey Amerika'da Atlantik somonlar (*S. salar*) için kullanılan lisanslı enjektabl DNA aşısı mevcuttur. Bunun dışında başka ülkelerde lisanslı aşısı mevcut değildir (OIE, 2016).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Örnekleme

Bu tez çalışmasında ülkemizin altı farklı bölgesinde bulunan (Marmara, İç Anadolu, Doğu Anadolu, Ege ve Karadeniz) gökkuşuğu alabalığı (*O. mykiss*) işletmelerinde IPNV, IHNV ve VHSV'lerin tespiti için örnekleme yapıldı. Örnekleme, Ocak 2014-Ocak 2017 tarihleri arasında, 6 farklı bölgedeki 21 alabalık çiftliğinden yapıldı (Şekil 2). Çiftliklerin dördünden her ay örnekleme yapılırken on yedisinden mevsimsel olarak örnekler alındı. Örnekleme, balıklar ve örneklemenin yapılacağı havuzlar rastgele seçildi. Örneklenen balıklar alındıktan hemen sonra herhangi bir işlem yapılmadan ağzı kilitli poşetlere yerleştirilip strafor kutular içinde, buz aküleri ile desteklenerek en geç 48 saat içerisinde laboratuvara ulaştırıldı. Örnekleme yapılan işletmelerdeki suyun sıcaklık, oksijen ve pH değerleri oksijenmetre (SI Analytics Handylab Multi 12 Set, Almanya) ile ölçülerek kaydedildi. Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen 17.03.2014 tarih ve 2014-06/09 sayılı etik kurul belgesi onayıyla yürütüldü.



Şekil 2: Örnekleme yapılan bölgeler. Yeşil noktalar balık çiftliklerini, kırmızı noktalar IPNV pozitif çiftlikleri, mavi noktalar IPNV negatif çiftlikleri, siyah noktalı kırmızı noktalar filogenetik çalışmada kullanılan suşların alındığı çiftlikleri temsil etmektedir.

Çalışmada örnekleme yapılan 13408 örnek, her bir grupta 8 balık/yumurta/genital sıvı olacak şekilde gruplandı. İç Anadolu Bölgesi'nde iki farklı çiftlikten (aylık örnekleme) 456 grup, Ege Bölgesi'nde dört farklı çiftlikten (ikisinden aylık, ikisinden mevsimsel örnekleme) 908 grup, Akdeniz Bölgesi'nde altı farklı çiftlikten (mevsimsel örnekleme) 80 grup, Doğu Anadolu Bölgesi'nde bir çiftlikten (mevsimsel örnekleme) 67 grup, Marmara Bölgesi'nde üç farklı çiftlikten (mevsimsel örnekleme) 76 grup ve Karadeniz Bölgesi'nde beş farklı çiftlikten (mevsimsel örnekleme) 89 grup olmak üzere toplam 1676 grup çalışmada incelendi (Tablo 2).

Tablo 2: Örnekleme yapılan bölgelerdeki işletmelere ait örnekleme sayıları

Bölge/Şehir	Çiftlik Sayısı	Grup/Örnek Sayısı*
İç Anadolu Bölgesi Kayseri Sivas	1 1	330 grup/ 2640 örnek 126 grup/ 1008 örnek
Ege Bölgesi Muğla	4	908 grup/ 7264 örnek
Akdeniz Bölgesi Adana Isparta Antalya Kahramanmaraş	1 2 2 1	22 grup/ 176 örnek 11 grup/ 88 örnek 11 grup/ 88 örnek 36 grup/ 288 örnek
Doğu Anadolu Bölgesi Elazığ	1	67 grup/ 536 örnek
Marmara Bölgesi Bursa Kütahya Sakarya	1 1 1	3 grup/ 24 örnek 17 grup/ 136 örnek 56 grup/ 448 örnek
Karadeniz Bölgesi Rize Samsun Trabzon	3 1 1	84 grup/ 672 örnek 4 grup/ 32 örnek 1 grup/ 8 örnek
Toplam	21	1676 grup/ 13408 örnek

*Herbir grupta 8 adet örnek bulunmaktadır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Balık Örneklerinin Hazırlanması

Balık örnekleri, dış bakıda herhangi bir hastalık belirtisi veya anomali gösterip göstermeme yönüyle incelendi. İncelemesi yapılan balıkların ortalama boy ve ağırlıkları ölçülerek kayıt altına alındı. Daha sonra boylarına göre her bir grupta 5-10 balık (4 cm'den büyük balıklardan 5-8, 4 cm'den küçük balıklardan 8-10 balık) yer alacak şekilde örnekleme grupları oluşturuldu (OIE, 2006).

Bu gruplarda yer alan balıklar;

- 4 cm'den küçükse kuyruk kısmı kesilip geriye kalan tüm kısımlar,
- 4-6 cm arasındaysa böbrekle birlikte tüm iç organlar,
- 6 cm'den büyükse ön böbrek, karaciğer, dalak ve kalp alınarak Nüve MN120

class II biyogüvenlik kabini (Nüve, Türkiye) içerisinde steril kumla ezilerek homojenize edildi.

Homojenize edilen dokulardan 100 mg alınarak RNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere RNAlater (Qiagen, Hilden, Almanya) içerisinde fikse edildi. Geriye kalan homojenize doku materyalleri steril santrifüj tüplerine alındıktan sonra üzerine %5 antibiyotik-antimikotik solüsyonu (10000 IU/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin, 0,025 mg/ml amfoterisin B, Biological Industries, İsrail), %1 FCS (fötal dana serumu, Biochrom, Almanya) ve %1 HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, Biochrom, Almanya) içeren EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium, Sigma-Aldrich, ABD) vasat ilave edildi. Homojenize dokularla EMEM vasat arasındaki son oran 1:10 olacak şekilde ayarlandı. Steril santrifüj tüplerindeki homojenizat-vasat karışımı soğutmalı santrifüjde (Thermo Fisher Scientific SL8R, ABD) 4°C'de, 3500 rpm'de, 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant toplanıp 0,45 µm por çapındaki şırınga filtrelerden (Sartorius, ABD) geçirildi (OIE, 2006). Filtrelenerek sterilize edilen süpernatantlar 1-2 ml'lik alikotlara bölündü. Hazırlanan örnekler hemen kullanılacaksa 4°C'de, uzun süre saklanacak ise -75±5°C'de muhafaza edildi.

3.2.2 Hücre Kültürü

Virüs izolasyon çalışmalarında BF-2 ve EPC hücre hatları kullanıldı. Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden temin edilen BF-2 ve EPC hücre kültürleri -80°C'lik derin dondurucudan çıkarılarak içerisinde %10 FCS (Biochrom, Almanya), %1 antibiyotik+antimikotik solüsyonu (Biological Industries,İsrail) ve %1 oranında HEPES (Biochrom, Almanya) bulunan EMEM (Sigma-Aldrich, ABD) vasatı içerisinde süspansiyon edildi. Süspansiyon edilen hücreler virüs ekimi için doku kültürü flasklarında ve 24 gözlü hücre kültürü pleytlerinde (Grainer-Bio-one GmbH, Almanya) 24°C'de soğutmalı inkübatörde (Nüve ES120, Türkiye) inkübe edildi.

Hücreler, flask yüzeyinin %100'nü kapladığında vasat döküldü ve hücre yüzeyi 25 cm²'lik flasklarda 2 ml, 75 cm²'lik flasklarda 8 ml, 175 cm²'lik flasklarda ise 15 ml %0,25 Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, ABD) solüsyonu ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra %0,25 Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, ABD) solüsyonu

tamamen döküldü ve yeniden içerisine 25 cm²'lik flasklarda 2 ml, 75 cm²'lik flasklarda 8 ml, 175 cm²'lik flasklarda 15 ml %0,25 Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, ABD) solüsyonu ilave edilip tüm hücre yüzeyi ile temas ettikten sonra tamamen döküldü ve 24°C'lik inkübatöre (Nüve ES120, Türkiye) kaldırıldı. Hücreler tamamen ayrıldığında hazırlanacak pleyt sayısına uygun miktarda hücre vasatı içinde pipetaj yapılarak homojenize edildi. Homojenize edilen hücreler bölme oranına göre 24 saatte %80-90 monolayer olacak şekilde 24 gözlü pleytlere 1000 ml/göz olacak şekilde dağıtıldı ve 24°C'lik soğutmalı inkübatöre (Nüve ES120, Türkiye) kaldırıldı (Tablo 3). Ekimden 24 saat sonra %80-90 monolayer olan hücreler daha önceden elde edilen süpernatantların ekimi için kullanıldı.

Tablo 3: BF-2 ve EPC hücre hatlarının 24 gözlü pleytlere için bölme oranları

Hücre	25cm ²	75cm ²	175cm ²
BF-2	1:1	1:2-3	1:9
EPC	1:1	1:3-4	1:12-15

3.2.3 Virüslerin İzolasyonu

Alınan örneklerden hazırlanan süpernatantlar hem BF-2 hem de EPC hücre hatlarına ekildi. Virüs ekimi için kullanılan hücre kültürleri %10 FCS, %1 antibiyotik-antimikotik solüsyonu ve %1 HEPES içeren EMEM vasatı kullanılarak üretildi. Hücre kültürlerinin tek katmanlı üremeleri %80-90 oranına ulaşınca örneklerden hazırlanan süpernatantlar 1:10 ve 1:100 oranlarında olmak üzere iki dilüsyonda adsorbsiyonsuz olarak BF-2 ve EPC hücre kültürlerine inokule edildi. İnokulasyon yapılan pleytlere 15°C'de 7-10 gün inkübasyona bırakıldı ve invert mikroskop (Olympus CKX4, Japonya) ile CPE yönünden düzenli olarak her gün kontrol edildi. Her pleytte 2 adet göz, hücre kontrol gözü olarak ayrıldı. CPE görülmeyen gözlerden ikinci pasaj için yeni hücre kültürlerine subkültür yapıldı. Hücre kültürlerinde görülen CPE'ler alanın % 90-95'ini kapladığında, CPE görülen örnekler -80°C'de dondurulup oda sıcaklığında çözündürüldü. Çözündürülen örnekler steril endorf tüplerine alınarak soğutmalı santrifüjde (Thermo Fisher Scientific SL8R, ABD) 3500 rpm'de, 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi (OIE, 2006). Santrifüj

işleminde sonra elde edilen süpernatantlar ELISA ve RT-PCR testlerinde kullanılmak üzere -80°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı.

Örneklerin hücre kültürlerinde inkübasyonu sırasında bakteriyel ve/veya fungal kontaminasyon olması durumunda kontamine süpernatantlar, antibiyotik-antimikotik solüsyonu (Biological Industries, İsrail) eklenerek 15°C'de 1 saat bekletildikten sonra 0,45 µm por çapında şırınga filtrelerden (Sartorius, ABD) geçirilerek sterilize edildi. Yeniden sterilize edilen süpernatantların ekimleri tekrarlandı.

3.2.4 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Yapılan örneklemelerde hücre kültüründe CPE gösteren ve virüs varlığı yönünden pozitif kabul edilen örneklere IPNV, IHNV, VHSV ELISA (Bio-X Diagnostic, Belçika) testleri uygulandı. ELISA test sonuçları üretici firmanın yönergelerine uygun olarak Multiskan GO Microplate Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, ABD)'de 450 nm dalga boyunda okutuldu.

3.2.5 Nötralizasyon Testi

Yapılan çalışmalarda hücre hatlarında IPNV varlığının diğer virüslerin çoğalmasını baskıladığı, bu nedenle VHSV ve IHNV'nin teşhisinde IPNV-nötralizasyon testinin uygulanması gerektiği belirtildiğinden CPE görülen örneklere IPNV nötralizasyon testi uygulandı (OIE, 2006).

CPE görülen gözlerden toplanan süpernatantlardan 10⁻³ dilüsyonu hazırlandı. Bu dilüsyonlara Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden temin edilen SN₅₀ (Serum nötralizasyon değeri) titresinde anti-IPN antiserum Sp ve Ab aşağıda belirtildiği gibi eklendi.

- 1. tüpe 10⁻³ oranında dilüe edilmiş hücre kültürü süpernatantından 0,3 ml ve 0,3 ml vasat (pozitif kontrol),
- 2. tüpe 10⁻³ oranında dilüe edilmiş hücre kültürü süpernatantından 0,3 ml ve 0,3 ml anti-IPN antiserum Sp,

- 3. tüpe 10^{-3} oranında dilüe edilmiş hücre kültürü süpernatantından 0,3 ml ve 0,3 ml anti-IPN antiserum Ab eklendi.

Hazırlanan tüpler 15°C 'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 24 gözlü hücre kültürü pleytlerinin ilk sıradaki 6 gözüne anti-IPN antiserum Sp ile nötralize edilmiş 10^{-3} dilüsyonundan 0.15 ml/göz olacak şekilde, ikinci sıradaki 6 gözüne anti-IPN antiserum Ab ile nötralize edilmiş 10^{-3} dilüsyonundan 0.15 ml/göz olacak şekilde ve son olarak üçüncü sıradaki 6 gözüne pozitif kontrol tüpü inokule edildi. En alttaki 6 göz, hücre kontrol olarak kullanıldı. Ekim yapılan pleytler 7 gün boyunca CPE oluşumu yönünden mikroskopik olarak incelendi.

3.2.6 Süpernatantlardan RNA Ekstraksiyonu ve İzolasyonu

ELISA testinde pozitif sonuç veren süpernatantlardan RNA ekstraksiyonu yapmak için Qiazol (Qiagen, Hilden, Almanya) ve RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda uygulandı. Bunun için öncelikle 1 ml Qiazol (Qiagen, Hilden, Almanya) ile 100 μl süpernatant karıştırılıp 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 0,2 ml kloroform eklendikten sonra 15 saniye yavaş hareketlerle çalkalandı ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Hazırlanan karışım 4°C 'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüjde (Thermo Fisher Scientific SL8R, ABD) 11400 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası en üst katmandaki sıvı kısım pipet ile alınarak ayrı bir ependorf tüpüne aktarıldı. Ayrılan sıvı kısmın üzerine eşit miktarda etanol eklendi ve pipetaj yapıldı. Hazırlanan karışım RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya)'ine ait spin kolona aktarıldı ve üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA'lar NanoDrop 1000 Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, ABD)'de ölçüldü. RNA saflığı için kullanılan 260/280 değerinin ~ 2.0 , 260/230 değerinin ise ~ 2.2 olmasına dikkat edildi. İzole edilen RNA'lar RT-PCR testinde kullanılmak üzere -80°C 'de muhafaza edildi.

3.2.7 Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

ELISA testinde pozitif sonuç veren örneklerle doğrulama amacı ile RT-PCR yapıldı. RT-PCR için One-Step RT-PCR Kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) üretici

firmanın yönergeleri doğrultusunda uygulandı. Kullanılan master miks oranı, kite ait kullanım yönergesine göre hazırlandı. IPNV'nin doğrulaması için spesifik VP2 gen bölgesinin amplifikasyonunda; RNase-free su, 5xPCR Buffer (TrisCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 12,5 mM MgCl₂, DTT), 10 mM *forward* ve *reverse* primerler, QIAGEN OneStep RT-PCR enzim miksi (1 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mM EDTA, 0.5% (v/v) Nonidet P-40, 0.5% (v/v) Tween 20, 50% glycerol (v/v), stabilizer; pH 9.0) ve 10 mM dNTP içeren RT-PCR master miksine 100 ng örnek RNA da eklenerek toplam 25 µl RT-PCR karışımı oluşturuldu. Kullanılan WB1, 5'CCGCAACTTACTTGAGATCCATTATGC-3' (*forward*) ve WB2, 5'CGTCTGGTTCAGATTCCACCTGTAGTG-3' (*reverse*) primerleri ile amplifikasyon aşamasındaki sıcaklık ve zamanlar, Williams ve ark. (1999)'nın çalışmasından modifiye edilerek hazırlandı. Oluşturulan karışım BioRad T100 Thermal Cycler (BioRad, ABD) cihazında 50°C'de 30 dakika ters transkriptaz aşamasını takiben 95°C'de 15 dakika PCR başlangıcı aşaması ve ardından 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 65°C'de 30 saniye primer bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama olmak üzere 40 siklus ve 72°C'de 10 dakika final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

RT-PCR ile amplifikasyon sonucunda 206 bp'lik amplifikasyon ürününün görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi. Bu testte pozitif kontrol olarak kullanılan IPNV Sp serotipi Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden temin edildi.

3.2.8 Jel Elektroforez

RT-PCR sonucu oluşan amplifikasyon ürünü Thermo Scientific 6X Orange Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile boyandı. Boyanan PCR ürünleri ve Thermo Scientific 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD), 1xTAE buffer (40 mM tris, 20 mM acetic acid, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid) (Invitrogen, Eugene, Oregon, ABD) içerisinde, etidyum bromid (Invitrogen, Eugene, Oregon, ABD) ilave edilmiş %1'lik (w/v) SeaKem agaroz jelde (Lonza, İsviçre) 90 V'da 60 dakika elektroforez işlemine tabi tutuldu. Ardından jel, BioRad UV Translüminatörde (BioRad, ABD) görüntülendi. Sonuçta 206 bp düzeyinde bant veren örneklerin IPNV yönünden pozitif olduğu kabul edildi.

3.2.9 Dokulardan RNA Ekstraksiyonu ve İzolasyonu

ELISA ve RT-PCR testlerinde IPNV pozitif sonuç veren ve RNA later içerisinde fikse edilmiş doku örneklerinden RNA ekstraksiyonu yapmak için süpernatantlardan yapılan RNA ekstraksiyonuna benzer şekilde Qiazol (Qiagen, Hilden, Almanya) ve RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda uygulandı. Bunun için 1 ml Qiazol içerisine 20-100 mg doku koyuldu. TissueLyser (Qiagen, Hilden, Almanya) cihazında 25 Hz' de 5 dakika parçalandı ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından üzerine 0,2 ml kloroform eklendikten sonra 15 saniye çalkalandı ve oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildi. Hazırlanan karışım 11400 rpm' de 4°C' de 15 dakika santrifüj (Thermo Fisher Scientific SL8R, ABD) edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı fazdan 400-450 µl alınarak farklı bir eppendorf tüpüne aktarıldı. Ayrılan sıvı kısmın üzerine eşit miktarda etanol eklendi ve pipetaj yapıldı. Hazırlanan karışım RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya)'ine ait spin kolona aktarıldı ve üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA'lar NanoDrop 1000 Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, ABD)'de ölçüldü. RNA saflığı için kullanılan 260/280 değerinin ~2.0, 260/230 değerinin ise ~2.2 olmasına dikkat edildi. İzole edilen RNA'lar Eş Zamanlı Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) testinde kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.10 Eş Zamanlı Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)

Dokudan izole edilen RNA'lar daha önceden ELISA ve RT-PCR testlerinde pozitif sonuç veren örnekler olmasına rağmen doğrulama amacıyla bu RNA'larla da RT-qPCR yapıldı. RT-qPCR için One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda uygulandı. Kullanılan master miks oranı, kit içerisinden çıkan yönerge kitabına göre modifiye edildi. IPNV'nin doğrulaması için IPNV'nin spesifik VP3 gen bölgesinin amplifikasyonunda; RNase-free su, 5xPCR Buffer, 10 mM *forward* ve *reverse* primerler, 10 µM prob, 10 mM dNTP, 50 mM MgCl₂, QIAGEN OneStep RT-PCR enzim miksi ve 4 µl (500-1000 ng) örnek RNA içeren 15 µl PCR master miksi oluşturuldu (Qiagen, Hilden, Almanya). Kullanılan VP3F : 5'-CGACCGACATGAACAAAATCA-3' (*forward*), VP3R : 5'-

TGTGCGAATACAGCTGCAACT-3' (*reverse*) primerleri ve VP3 probe : 5'-6FAM- TCTAGCCAACAGTGTGTACGGCCTCCC-TAMRA-3' probu ile amplifikasyon aşamasındaki sıcaklık ve zamanlar, Ørpetveit ve ark. (2010) çalışmasından modifiye edilerek hazırlandı. Oluşturulan karışım AriaMx Real Time PCR System (Agilent Technologies, ABD) cihazında 50°C'de 30 dakika ters transkriptaz aşamasını takiben 95°C'de 15 dakika PCR başlangıcı aşaması ve ardından 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 58°C'de 30 saniye primer bağlanma ve 72°C'de 30 saniye uzama olmak üzere 40 siklus olarak amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

3.2.11 cDNA Hazırlanması

Filogenetik sınıflandırmada kullanılacak olan VP2 ve VP5 gen bölgeleri çoğaltılmadan önce IPNV yönünden pozitif olan RNA'lerden cDNA hazırlandı. Bunun için SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Eugene, Oregon, ABD) üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda uygulandı. cDNA sentezi için; 10 mM *random hexameters*, 10 mM dNTP, DEPC-su (Diethylpyrocarbonate) ve 1000 ng örnek RNA 65°C' de 5 dakika inkübe edildikten sonra 5x *First Strand Buffer*, (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 0,1M DTT (Dithiothreitol), 40 U/µl RNaseOUT ve 200 U/µl Superscript III RNase Reverse Transcriptase eklendi ve önce 25°C'de 5 dakika, ardından 50°C'de 1 saat inkübe edildi. Son olarak reaksiyon 70°C' de 15 dakikada sonlandırıldı. Hazırlanan cDNA'lar VP2 ve VP5 gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.12 VP2 ve VP5 Gen Bölgeleri İçin Primer Dizaynı

IPNV'nin VP2 ve VP5 gen bölgelerinin çoğaltılmasında bu çalışma için dizayn ettiğimiz tablo 4'te verilen primerler kullanıldı. Primer dizaynında kullanılan referans suşların IPNV'nin tüm genotiplerini içermesine dikkat edildi. NCBI veritabanında yer alan IPNV'lerin VP2 ve VP5 gen bölgesi sekansları fasta formatında indirildi ve Vector NTI yazılımında çoklu hizalama işlemine tabi tutuldu. Tüm IPNV'ler için ortak olan ve primer için uygun GC oranına sahip kısımlar alınarak DesignerPCR primer sentezleme programında incelendi. Primer sentezlemek için seçilen bölgelerin GC içerikleri, oligonükleotid dimer, saç tokası (*hairpin*) ve

erime sıcaklık yapıları (T_m) bu program ile analiz edildi. Sonuçta hem VP2 hem de VP5 için uygun *forward* ve *reverse* primer dizimleri tespit edildi. Bu primerler, IPNV'nin VP2 gen bölgesi için en çok varyasyon görülen 731 bp'lik, VP5 gen bölgesi için ise 507 bp'lik kısımları kodlayacak şekilde dizayn edildi (Tablo 4). Son olarak dizayn edilen primerlerin başka bölgelerle örtüşüp örtüşmediği NCBI Primer Blast arayüzü kullanılarak analiz edildi.

Tablo 4: VP2 ve VP5 primer dizileri ve ampikon büyüklükleri

Hedef Bölge	Primerler	Primer Dizisi	Ampikon Büyüklüğü
VP2	VP2 396-416 F VP2 1126-1148 R	5'-GGTGGAGAGCCTGACCTACAA-3' 5'-GGATCAGCTCGTAGTTGGACACT-3'	731 bp
VP5	VP5 13-30 F VP5 620-642 R	5'-CACAAACAAGGCAACCGC-3' 5'-GTCAACAACCAGCTGGTGACCAA-3'	507 bp

3.2.13 VP2 ve VP5 Gen Bölgelerinin Çoğaltılması

VP2 ve VP5 gen bölgelerinin çoğaltılmasında tablo 4'te verilen primer setleri kullanıldı. Bu bölgelerin çoğaltılmasında Invitrogen DreamTaq DNA Polymerase (Invitrogen, Eugene, Oregon, ABD) kiti üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda kullanıldı. Daha önceden IPNV pozitif RNA'lerden hazırlanan ve -20°C'de saklanan cDNA'lar VP2 ve VP5 gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanıldı.

DreamTaq Polymerase (5 U/μl), 10xPCR Buffer (20 mM MgCl₂ içerir), 10 mM *forward* ve *reverse* primerleri, 10 mM dNTP ve dH₂O içeren PCR master miksinde örnek 4 μl cDNA da eklenerek toplam 50 μl PCR karışımı oluşturuldu. Oluşturulan karışım BioRad T100 Thermal Cycler (BioRad, ABD) cihazında VP2 gen bölgesi için 95°C'de 3 dakika PCR başlangıcı aşamasının ardından 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 56°C'de 30 saniye primer bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama olmak üzere 40 siklus ve 72°C'de 10 dakika final uzama koşullarında; VP5 gen bölgesi için ise 95°C'de 3 dakika PCR başlangıcı aşamasının ardından 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 59°C'de 30 saniye primer bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama

olmak üzere 40 siklus ve 72°C'de 10 dakika final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

Oluşan amplifikasyon ürünleri Thermo Scientific 6X Orange Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile boyandı. Boyanan PCR ürünleri ve 1 Kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD), 1xTAE buffer içerisinde SYBERSafe DNA (Invitrogen, Eugene, Oregon, ABD) jel boyası ilave edilmiş %1'lik (w/v) Ultra Pure agaroz jelde (Invitrogen, Eugene, Oregon, ABD) 90V'da 60 dakika elektroforez işlemine tabi tutuldu. Ardından jel, BioRad UV Translüminatörde (BioRad, ABD) analiz edildi. Sonuçta VP2 gen bölgesi için 731 bp, VP5 gen bölgesi için ise 507 bp düzeyinde gözlenen bantlar klonlama işleminde kullanılmak üzere Safe Imager Blue Light Transilluminator (Thermo Fisher Scientific, ABD)'de görüntülenerek jelden kesildi.

3.2.14 DNA Ürünlerinin Jelden Pürifiye Edilmesi

Pürifikasyon işlemi için PCR Clean-up Gel Extraction kiti (Macherey-Nagel, Almanya), üretici firmanın yönergelerine göre uygulandı. Jelden pürifiye edilen DNA'ların konsantrasyonları NanoDrop 1000 Spektrofotometrede (Thermo Fisher Scientific, ABD) ölçüldü. Pürifiye edilen DNA'lar klonlama işlemi için -20°C'ye kaldırıldı.

3.2.15 VP2 ve VP5 Gen Bölgelerinin Klonlanması

Klonlama için daha önceden jelden pürifiye edilip saklanan örnekler kullanıldı. Klonlamada Topo TA Cloning Vector 2.1 kit (Invitrogen, Eugene, Oregon, ABD) ve TOP10 One-Shot Chemically Competent *E.coli* (Invitrogen, Eugene, Oregon, ABD) kompetan hücreleri üretici firmaların yönergeleri doğrultusunda kullanıldı. Klonlanan *E.coli* bakterileri ampisillin eklenmiş ve üzerine 40 µl X-gal 5-(Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) emdirilmiş LB (Luria Bertani) agara ekildi. Bir gece 37°C'de inkübasyondan sonra üremiş olan kolonilerden yalnızca beyaz veya açık mavi olanlarından alınarak ampisillin eklenmiş 200 µl LB medyum içerisine alındı ve homojenize edildi. Koloni eklenmiş LB+ampisillin medyumlar 200 rpm'de çalkalanarak 37°C'de 3-4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında herbir LB+ampisillin medyumunda üremiş bakterilerden

alınan 1 µl örnekle koloni PCR yapıldı. Koloni PCR'da M13 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3 (*forward*) ve M13 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (*reverse*) primerleri ve DreamTaq DNA Polymerase (Invitrogen, Eugene, Oregon, ABD) kiti üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda kullanıldı. DreamTaq Polymerase (5 U/µl), 10xPCR Buffer (20 mM MgCl₂ içerir), 10 mM forward ve reverse primerleri, 10 mM dNTP ve dH₂O içeren PCR master miksinde 1 µl örnek eklenerek toplam 25 µl PCR karışımı oluşturuldu. Oluşturulan karışım BioRad T100 Thermal Cycler (BioRad, ABD) cihazında 3 siklus 94°C 1 dakika ve 55°C 1 dakika bakterinin parçalanması aşamasından sonra 94°C'de 2 dakika PCR başlangıcı aşamasının takiben 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 55°C'de 30 saniye primer bağlanma, 72°C'de 40 saniye uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 7 dakika final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Koloni PCR sonrası oluşan amplifikasyon ürünleri 6X Orange Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile boyandı. Boyanan PCR ürünleri ve Thermo Scientific 1 Kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD), 1xTAE buffer içerisinde SYBERSafe DNA (Invitrogen, Eugene, Oregon, ABD) jel boyası ilave edilmiş %1'lik (w/v) Ultra Pure agaroz jelde (Invitrogen, Eugene, Oregon, ABD) 90 V'da 45 dakika koşuturuldu. Ardından jel, BioRad UV Translüminatörde (BioRad, ABD) analiz edildi. Klonan örneklerin bulunduğu LB+ampisillin medyumlardan 100 µl alınarak 5 ml LB+ampisillin medyum içerisine eklendi ve bir gece 200 rpm'de 37°C'de inkübe edildi.

3.2.16 Plazmid DNA Pürifikasyonu

Pozitif sonuç veren ve bir gece LB+ampisillin medium içerisinde inkübe edilen örneklere Plazmid DNA pürifikasyon işlemi yapıldı. Bunun için Plazmid DNA Pürifikasyon kiti (Macherey-Nagel, Almanya) üretici firmanın yönergelerine göre uygulandı. Pürifiye edilen plazmid DNA'ların konsantrasyonu NanoDrop 1000 Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, ABD)'da ölçüldü. Sekans işlemine gönderilen örnekler µl'sinde 50 ng DNA olacak şekilde dilüe edildi. Sekanslama işlemi, GATC-Biotech AG (Constance, Almanya) firmasında hizmet alımı yöntemiyle gerçekleştirildi.

3.2.17 Filogenetik Analiz

Hem nükleotit hem de aminoasit sekanslarına AlignX (Vector NTI Advance™ 11, InfoMax, Inc) ve MEGA6.06 yazılımı kullanılarak çoklu hizalama (*alignment*) işlemi yapıldı (Tamura ve ark., 2013). Nükleotit ve aminoasit benzerlikleri SIAS (Sequences Identities and Similarities) hizmeti kullanılarak hesaplandı. Filogenetik ağaçların oluşturulmasında MEGA6.06 yazılımı tarafından en uygun model olarak önerilen HKY+6 modeli kullanıldı ve konsesus ağaçları maksimum olabilirlik yöntemi (*Maximum likelihood*) kullanılarak çizdirildi. Ağaçlar çizdirilirken 1000 özyükleme (*bootstrap*) yaptırıldı (Hillis ve ark., 1993; Hungnes ve ark., 2000).

3.2.18 TCID₅₀ (Doku Kültürü Enfektif Dozu) Hesaplanması

Filogenetik ağaçta birbirinden farklı yerlerde bulunan ve aminoasit dizilimi bakımından farklılık gösteren 2 IPNV suşunun TCID₅₀ dozu hesaplandı. Bunun için Atlantik somon ön böbrek hücre hattı (TO) 2 adet 96 gözlük hücre pleytine 35000 hücre/göz olacak şekilde ekilerek 20°C'de 1 gün inkübe edildi. Seçilen 2 IPNV izolatının 1/10 (doku homojenizati/vasat) oranında hazırlanmış süpernatantları -80°C'de muhafaza edilen stoktan çıkarılarak inokulasyon için kullanıldı. 1/10 oranında hazırlanmış süpernatantlar, hücre kültüründe toksik etki yaratmasını önlemek için ½ oranında tekrardan dilüe edilerek titrasyon için ilk göze 1/20 oranında IPNV konuldu. Aynı şekilde hazırlanan 2 IPNV örneği 10⁰ (1/20 oranında supernatant)'dan başlayarak 10⁻⁸ e kadar dilüe edildi. Ekilen hücreler, gözlerdeki alanın %90-100'ünü kapladığında hazırlanan dilüsyonlar 4 paralel olacak şekilde pleytlere ekildi. Kontaminasyon riskini elimine etmek için 96 gözlü bir pleyt tek bir IPNV örneğinin ekimi için kullanıldı. Bu pleytlerdeki hücre üretme vasatı (%10 FCS ve gentamisin içeren) döküldükten sonra PBS (*Phosphate Buffered Saline*) ile bir defa yıkandı. Daha sonra hazırlanan IPNV dilüsyonlarından 50 µl ekildi. Takiben bu pleytlar 15°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra gözlere 100 µl virüs üretme vasatı (%2 FCS ve gentamisin içeren) eklendi. Pleytlar, 10 gün süreyle her gün CPE oluşumu yönünden mikroskopik olarak incelendi. Pleytlerdeki virüs ekimi yapılmamış gözler hücre kontrol gözü olarak takip edildi. Gözlerdeki CPE'lerin

takibi sonrasında seçilen her bir IPNV örneğinin TCID₅₀ dozu Spearman ve Kärber algoristamasına göre hesaplandı (Kärber, 1931; Spearman, 1908).

3.2.19 Hücresel İmmun Yanıtın Ölçülmesi

Hücresel immün yanıtında ölçülmesi için TO hücreleri 6 gözlü hücre pleytlerine 250000 hücre/göz olacak şekilde ekilerek 20°C'de 1 gün inkübe edildi. İnkübe edilen hücreler, gözlerdeki alanın %90-100'ünü kapladığında, seçilen IPNV izolatları 100TCID₅₀ dozunda 2 paralel olacak şekilde gözlerle ekildi. Virüs ekimi sonrası 0., 6., 12., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde pleytlerdeki hücreler toplandı. Aynı şekilde eş zamanlı olarak negatif kontrol olarak belirlenen gözlerdeki hücreler de toplandı. Toplanan hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA'lar RT-qPCR'da kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.20 Eş Zamanlı Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)

Hücrelerden izole edilen RNA'lar hücresel immün yanıtın ölçülmesinde kullanıldı. RT-qPCR için One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda uygulandı. Kullanılan master miks oranı, kit uygulama yönergesi modifiye edilerek hazırlandı. Seçilen TR16/14 ve TR82/15 örnekleri hücre kültürüne ekildikten sonra Mx protein, IFN ve Viperin (Vip) ekspresyonu yapıldı. Referans gen olarak daha önce yapılan çalışmalarda en stabil gen olduğu bildirilen EF1 α B kullanıldı. Kullanılan primer ve prob lar tablo 5'te verildi. Genlerin transkript seviyeleri ise Pfaffl metodu kullanılarak EF1 α B ekspresyonuna göre normalize edildi (Pfaffl, 2001).

Tablo 5: İmmün gen primer ve prob dizileri

Hedef Bölge	Primerler ve Problar	Primer Dizisi	Referans
EF1 α B	EF1 α BF EF1 α BR: EF1 α Bprob	5'- TGCCCTCCAGGATGTCTAC -3 5'-CACGGCCACAGGACTG -3' 5'-6FAM-'AAATCGGCGGTATTGG-MGBNFQ -3'	Løvoll ve ark., 2011,
IFN	IFN.F IFN.R IFN prob	5'- ACTGAAACGCTACTTCAAGAAGTTGA -3 5'- GCAGATGACGTTTTGTCTCTTCCT -3' 5'-6FAM-' TGTGCACTGTAGTTCATTTTTCTCAGAACA -TAMRA-3'	McBeath ve ark., 2006

Mx	MxF MxR Mxprob	5'- GATGCTGCACCTCAAGTCCTATTA -3 5'- CACCAGGTAGCGGATCACCAT -3' 5'-6FAM-' CTGATCAGCCAAACGTTGACTGGATATCCT -TAMRA-3'	McBeath ve ark., 2006
Vip	Vip F Vip R Vip prob	5'- AGCAATGGCAGCATGATCAG -3 5'- TGGTTGGTGTCTCGTCAAAG -3' 5'-6FAM-' AGTGGTTCCAAACGTATGGCGAATACCTG -BHQ-3'	Grove ve ark., 2013



4 BULGULAR

4.1 Örnekleme

Balık örneklemelerinde dış bakıda; renkte kararma, ekzoftalmus, asites, yalancı dışkı uzaması (pseudofeçes) gözlemlendi. Özellikle yavru balıklarda tankın kenarlarına toplanma ve dikine yüzme davranışları dikkat çekti. İç bakıda ise dalakta büyüme ve karın boşluğunda sıvı toplanması görüldü (Şekil 3).



Şekil 3: IPNV şüpheli balıklarda klinik görünüm a: Renkte kararma, ekzoftalmus, asites; b: Kısa oklar: Asites; Uzun oklar: Dışkı uzaması (Pseudofeçes); c: Dalakta büyüme; d: Ekzoftalmus ve asites

4.2 Hücre Kültüründe Virüs İzolasyonu ve ELISA Testi

Toplanan 13408 örnek 1676 gruba ayrıldıktan sonra virüs varlığı yönünden inceleme için BF-2 ve EPC hücre hatlarına ekildi. İncelenen 1676 grup örneğin 455

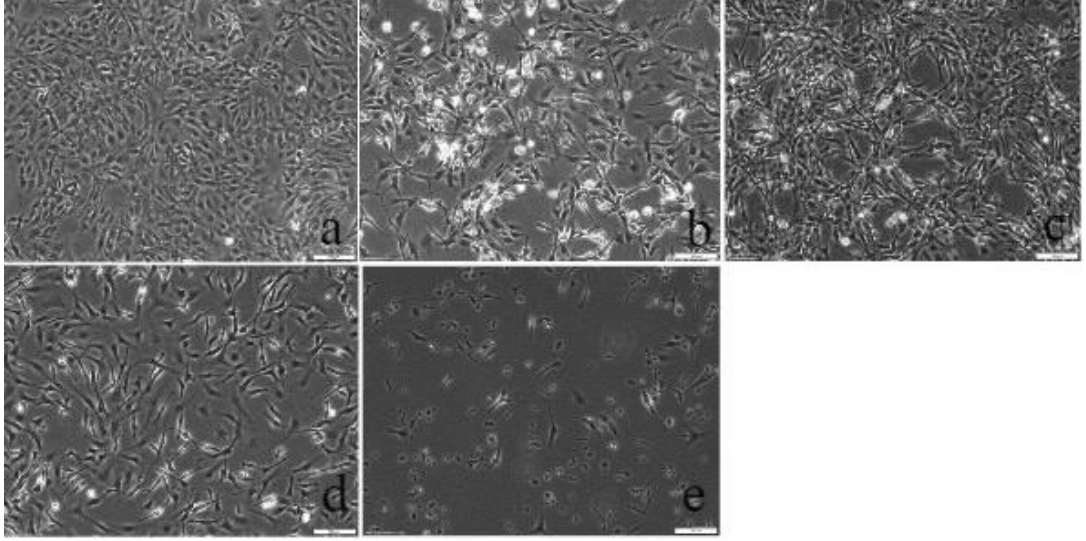
grubu hem BF-2 hem de EPC hücre hatlarında CPE gösterdi. Hücre hattında CPE görülen örnekler virüs varlığı yönünden pozitif kabul edildi. Pozitif olduğu belirlenen örneklerle IPNV, VHSV ve IHNV Ag-ELISA testleri uygulandı. ELISA testleri sonucunda CPE tespit edilen grupların tamamında IPNV pozitif bulunurken VHSV veya IHNV negatif sonuç verdi (Tablo 6).

Tablo 6: Örnekleme çalışmalarında IPNV pozitif olan örneklerin bölgesel dağılımı

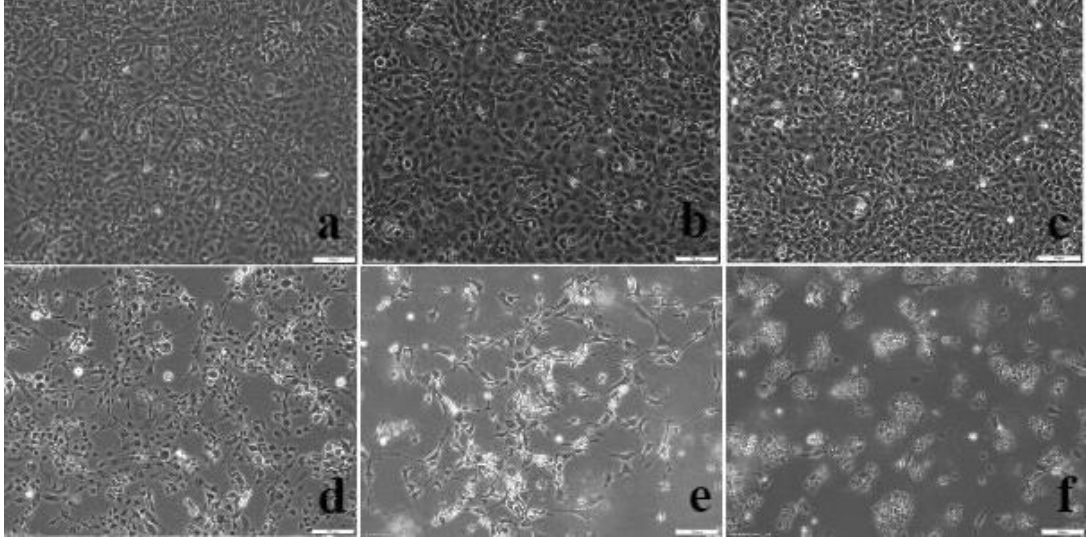
Bölge/Şehir	Grup/Örnek Sayısı*	IPNV Pozitif Grup/Örnek Sayısı*	IPNV Pozitif Örnek (%)
İç Anadolu Bölgesi Kayseri Sivas	330 grup/~2640 örnek 126 grup/~1008 örnek	103 grup/ ~824 örnek 35 grup/ ~280 örnek	%31,21 %27,7
Ege Bölgesi Muğla	908 grup/ ~7264 örnek	250 grup/ ~2000 örnek	%27,53
Akdeniz Bölgesi Adana Isparta Antalya Kahramanmaraş	22 grup/ ~176 örnek 11 grup/ ~88 örnek 11 grup/ ~88 örnek 36 grup/ ~288 örnek	5 grup/ ~40 örnek 2 grup/ ~ 16 örnek 0 grup/ 0 örnek 14 grup/ ~122 örnek	%22,72 %18,18 %0 %38,88
Doğu Anadolu Bölgesi Elazığ	67 grup/ ~536 örnek	17 grup/ ~136 örnek	%25,37
Marmara Bölgesi Bursa Kütahya Sakarya	3 grup/ ~24 örnek 17 grup/ ~136 örnek 56 grup/ ~448 örnek	3 grup/ ~24 örnek 2 grup/ ~ 16 örnek 14 grup/ ~ 122 örnek	%100 %11,76 %25
Karadeniz Bölgesi Rize Samsun Trabzon	84 grup/ ~672 örnek 4 grup/ ~32 örnek 1 grup/ ~8 örnek	10 grup/ ~80 örnek 0 grup/ 0 örnek 0 grup/ 0 örnek	%11,9 %0 %0
Toplam	1676 grup/ ~13408 örnek	455 grup/ ~3640 örnek	%27,14

*Herbir grupta 8 adet örnek bulunmaktadır.

BF-2 ve EPC hücre hatlarına yapılan inokulasyonlarda, IPNV-pozitif olan materyaller hücre içi vakuol oluşumu, hücre büzüşmesi ve çekirdek piknozlarıyla karakterize CPE'ler gösterdi. Örneklerin birçoğunda total hücre yıkımı 2-3 gün sonra gerçekleşti (Şekil 4 ve Şekil 5).



Şekil 4: BF-2 hücre hattında görülen CPE; a: BF-2 hücre hattı negatif kontrol; b: Virüs inokulasyonundan 24. saat sonra; c: Virüs inokulasyonundan 48. saat sonra d: Virüs inokulasyonundan 72. saat sonra; e: Virüs inokulasyonundan 96. saat sonra



Şekil 5: EPC hücre hattında görülen CPE; a: EPC hücre hattı negatif kontrol; b: Virüs inokulasyonundan 24 saat sonra; c: Virüs inokulasyonundan 48 saat sonra; d: Virüs inokulasyonundan 72 saat sonra; e: Virüs inokulasyonundan 96 saat sonra; f: Virüs inokulasyonundan 120 saat sonra

Tablo 7: IPNV pozitif olan örneklerin balık ağırlıklarına göre % dağılımı

Balık ağırlığı	IPNV Pozitif Grup/ Örnek	IPNV Pozitif Örnek (%)
< 1 g	187 grup/ ~1496 örnek	%41,09
1-5 g arası	81 grup/ ~648 örnek	%17,8
5-20 g arası	48 grup/ ~384 örnek	%10,54
20-300 g arası	44 grup/ ~352 örnek	%9,67
Anaç (3-6 kg)	17 grup/ ~136 örnek	%3,73
Keseli yavru	32 grup/ ~256 örnek	%7,03
Yumurta	29 grup/ ~232 örnek	%6,37
Genital sıvı	17 grup/ ~136 örnek	%3,73
Toplam	455 grup/ ~3640 örnek	%100

Tablo 8: IPNV pozitif olan örneklerin bölgelere göre ve balık ağırlıklarına göre dağılımı

Örnek	İç Anadolu Bölgesi	Marmara Bölgesi	Ege Bölgesi	Akdeniz Bölgesi	Doğu Anadolu Bölgesi	Karadeniz Bölgesi
< 1 g	74 grup	11 grup	82 grup	9 grup	7 grup	4 grup
1-5 g arası	19 grup	4 grup	51 grup	3 grup	2 grup	2 grup
5-20 g arası	11 grup	-	33 grup	2 grup	-	2 grup
20-300 g arası	9 grup	2 grup	33 grup	-	-	-
Anaç (3-6 kg)	9 grup	-	6 grup	-	1 grup	1 grup
Keseli yavru	5 grup	1 grup	19 grup	3 grup	3 grup	1 grup
Yumurta	4 grup	1 grup	21 grup	1 grup	2 grup	-
Genital sıvı	7 grup	-	5 grup	3 grup	2 grup	-
Toplam	138 grup	19 grup	250 grup	21 grup	17 grup	10 grup

4.3 Nötralizasyon Testi

Hücre kültüründe CPE oluşturan tüm gruplara IPNV nötralizasyon testi uygulandı. Test sonucunda nötralizasyon edilen grupların hiçbirinde CPE gözlenmemesi IPNV dışında başka bir CPE oluşturan virüs olmadığını gösterdi.

4.4 RNA İzolasyonu ve Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Hücre kültüründe CPE oluşumuna neden olan ve ELISA testinde IPNV pozitif sonuç veren 455 grup örnekten RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon sonrası RNA miktarı ve kalitesi NanoDrop 1000 Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, ABD) cihazında ölçüldü.

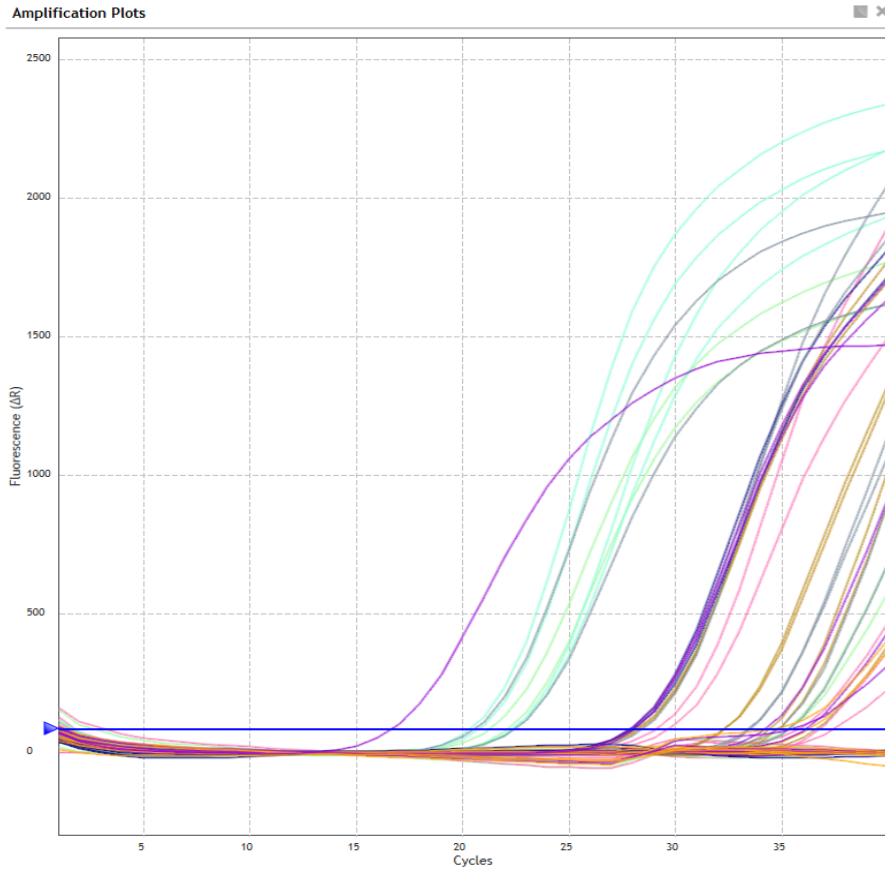
RNA izolasyonunun ardından IPNV Ag-ELISA ve nötralizasyon testlerini doğrulama amacıyla RT-PCR yapıldı. Daha önceden IPNV pozitif olan tüm gruplara (455 grup) yapılan RT-PCR sonucunda 206 bp'lik amplifikasyon ürünlerinin jelde görüntülenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Şekil 6).



Şekil 6: 206 bp'de pozitif sonuç veren IPNV örnekleri (100 bp Thermo Fisher Scientific (ABD) DNA Ladder kullanılmıştır).

4.5 Eş Zamanlı Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)

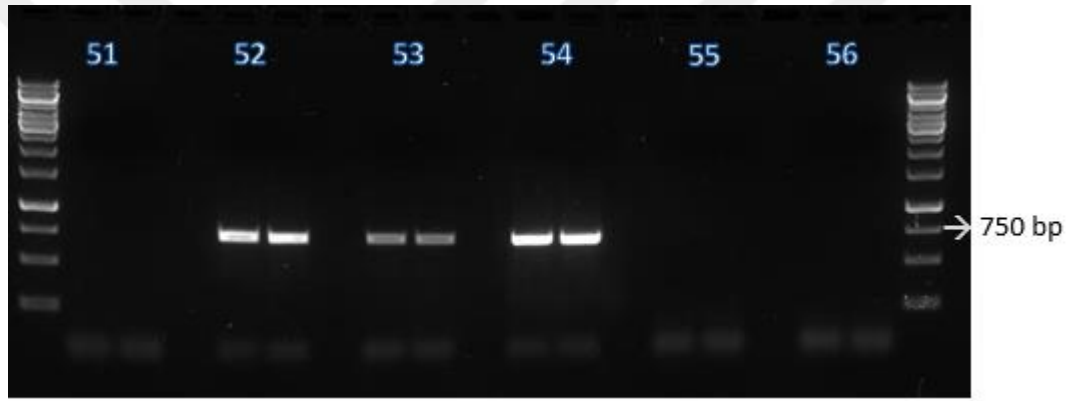
IPNV pozitif olduğu tespit edilen gruplara ait dokulardan elde edilen RNA'lara doğrulama amacıyla RT-qPCR yapıldı. RT-qPCR sonucunda örnek gruplarının 17 ile 33 arasında C_T değeri verdiği tespit edildi (Şekil 7).



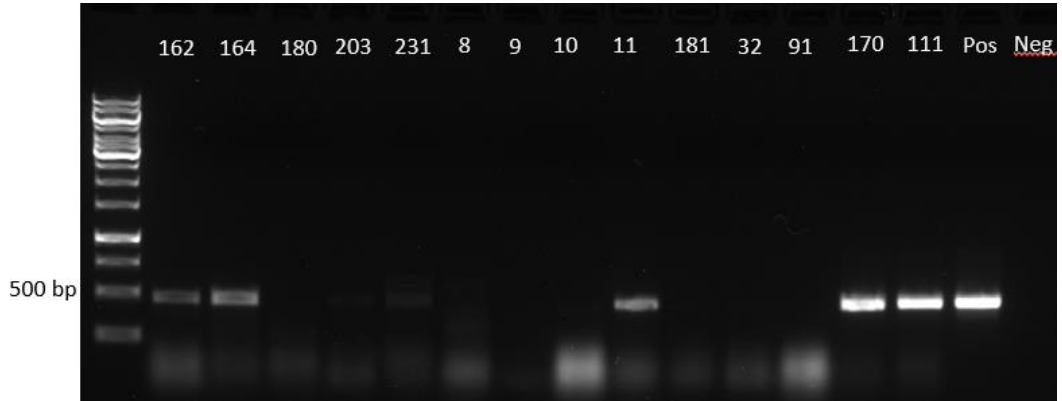
Şekil 7: RT-qPCR sonucu elde edilen C_T değerleri

4.6 VP2 ve VP5 Gen Bölgelerinin oğaltılması

Seçilen IPNV'lerin VP2 ve VP5 gen bölgeleri çoğaltılmadan önce RNA'lardan cDNA hazırlanarak PCR'la amplifiye edildi. Oluşan PCR ürünleri agaroz jelde yürütüldü. Seçilen bu otuz örneğin yirmi bir tanesinde VP2 gen bölgesi için 731 bp ve VP5 gen bölgesi için 507 bp düzeyinde güçlü ve tek bant elde edildi (Şekil 6 ve Şekil 7). Bu yirmi bir örnek PCR Clean-up Kit ile pürifiye edildikten sonra direkt sekanslama işlemine gönderildi. Diğer dokuz örneğin agaroz jel görüntülerinde zayıf veya çift bant gözlemlendi. Bu nedenle bu dokuz örnek klonlama işlemine tabi tutuldu.



Şekil 8: VP2 gen bölgesinin klonlama sonrası jel görüntüsü (1 Kb Thermo Fisher Scientific (ABD) DNA Ladder kullanılmıştır).



Şekil 9: VP5 gen bölgesinin klonlama sonrası jel görüntüsü (1 Kb Thermo Fisher Scientific (ABD) DNA Ladder kullanılmıştır).

4.7 DNA Ürünlerinin Jelden Pürifiye Edilmesi

Seçilen otuz örneğin zayıf bant veren dokuz tanesi agaroz jelden kesildi ve pürifiye edildi. Pürifiye edilen PCR ürünleri NanoDrop 1000 Spektrofotometre'de (Thermo Fisher Scientific, ABD) ölçüldü ve klonlama işleminde kullanıldı.

4.8 VP2 ve VP5 Gen Bölgelerinin Klonlanması

Agaroz jelden pürifiye edilen PCR ürünleri hem VP2 hem de VP5 gen bölgeleri için başarılı bir şekilde klonlandı. Klonlama sonucunda elde edilen plasmid DNA'lar Plasmid pürifiye edildikten sonra sekanslama işlemine gönderildi.

4.9 Filogenetik Analiz

Filogenetik analizde kullanılmak üzere örnekleme yapılan her bölgeyi temsil edecek şekilde 30 adet örnek seçildi. Bu 30 örneğin 28 tanesi gökkuşığı alabalığından (*O. mykiss*), 1 tanesi *Salmo trutta macrostigma* ve 1 tanesi de gökkuşığı alabalıkları ile birlikte aynı baraj gölünde bulunan sazan (*C. carpio*) balığından izole edildi (Tablo 9).

Tablo 9: Filogenetik analizde kullanılan örnekler.

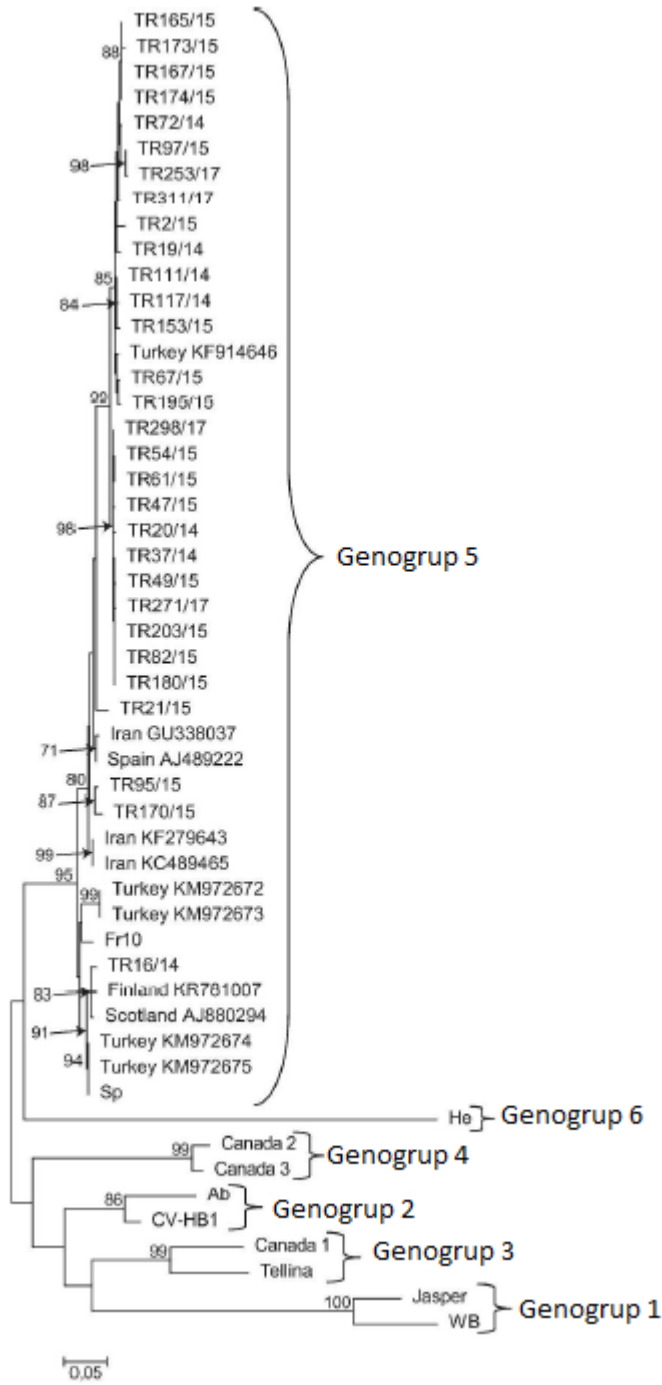
Örnek Kodu	^a Bölge (R)	Balık Türü	Balık Ağırlığı (g)	^b Örneklenen Doku	Aksesyon Numarası
TR2/15	R1	<i>O. mykiss</i>	250	Böbrek	KY986935
TR153/15	R1	<i>O. mykiss</i>	0.3	Tüm balık	KY986936
TR19/14	R2	<i>O. mykiss</i>	300	Dalak	KY986959
TR20/14	R2	<i>O. mykiss</i>	80	Böbrek	KY986936
TR21/15	R2	<i>O. mykiss</i>	0.2	Tüm balık	KY986943
TR95/15	R2	<i>O. mykiss</i>	15 g	Karaciğer	KY986960
TR97/15	R2	<i>O. mykiss</i>	0.4 g	Tüm balık	KY986944
TR72/14	R2	<i>O. mykiss</i>	5.6 g	Böbrek	KY986937
TR271/17	R2	<i>O. mykiss</i>	0.3	Tüm balık	KY986945
TR253/17	R2	<i>O. mykiss</i>	160 g	Böbrek	KY986938
TR298/17	R2	<i>O. mykiss</i>	7 g	Böbrek	KY986939
TR16/14	R2	<i>Salmo trutta macrostigma</i>	300 g	Böbrek	KY986963
TR37/14	R3	<i>O. mykiss</i>	0.24 g	Tüm balık	KY986946
TR203/15	R3	<i>O. mykiss</i>	0.15 g	Tüm balık	KY986947
TR82/15	R3	<i>O. mykiss</i>	0.5 g	Tüm balık	KY986948
TR47/15	R3	<i>O. mykiss</i>	100 g	Böbrek	KY986940
TR54/15	R3	<i>O. mykiss</i>	1.1 g	Tüm balık	KY986949
TR180/15	R3	<i>O. mykiss</i>	15 g	Kalp	KY986961
TR49/15	R3	<i>Cyprinus carpio</i>	350 g	Erkek gonad	KY986964
TR67/15	R4	<i>O. mykiss</i>	0.3 g	Tüm balık	KY986950
TR195/15	R4	<i>O. mykiss</i>	0.3 g	Tüm balık	KY986951
TR61/15	R4	<i>O. mykiss</i>	-	Gözlenmiş yumurta	KY986962
TR111/14	R5	<i>O. mykiss</i>	0.1 g	Tüm balık	KY986952
TR117/14	R5	<i>O. mykiss</i>	0.3 g	Tüm balık	KY986953
TR311/17	R5	<i>O. mykiss</i>	3 g	Böbrek	KY986941
TR165/15	R6	<i>O. mykiss</i>	0.26 g	Tüm balık	KY986954
TR167/15	R6	<i>O. mykiss</i>	0.5 g	Tüm balık	KY986955
TR170/15	R6	<i>O. mykiss</i>	0.24 g	Tüm balık	KY986956
TR173/15	R6	<i>O. mykiss</i>	0.3 g	Tüm balık	KY986957
TR174/15	R6	<i>O. mykiss</i>	0.3 g	Tüm balık	KY986958

^aÖrnek alınan bölgeler (R1=Karadeniz, R2=Ege, R3=İç Anadolu, R4=Marmara, R5=Akdeniz ve R6=Doğu Anadolu). ^bTotal RNA izolasyonunda 4 cm'den küçük balıklar tüm olarak alındı.

4.9.1 VP2

Bu tez çalışmasında her bölgeyi temsil edecek şekilde seçilen 30 IPNV izolatu ile Genbank'tan alınan ve genogrup 1-6'yı (Blake ve ark., 2001) temsil eden Sp (AF342728), Fr10 (AY026482), West Buxon (AF342727), Jasper (NC001915), Ab (AF342729), CV-HB1 (AY026489), Tellina virus 2 (AF342731), Canada 1 (AF342732), Canada 2 (AF342733), Canada 3 (AF342734), He (AF342730), Turkey (KF914646), Turkey (KM972672- KM972675), Iran (GU338037), Iran (KF279643), Iran (KC489465), Spain (AJ489222), Finland (KR781007), Scotland (AJ880294) sekansları kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu (Şekil 10).





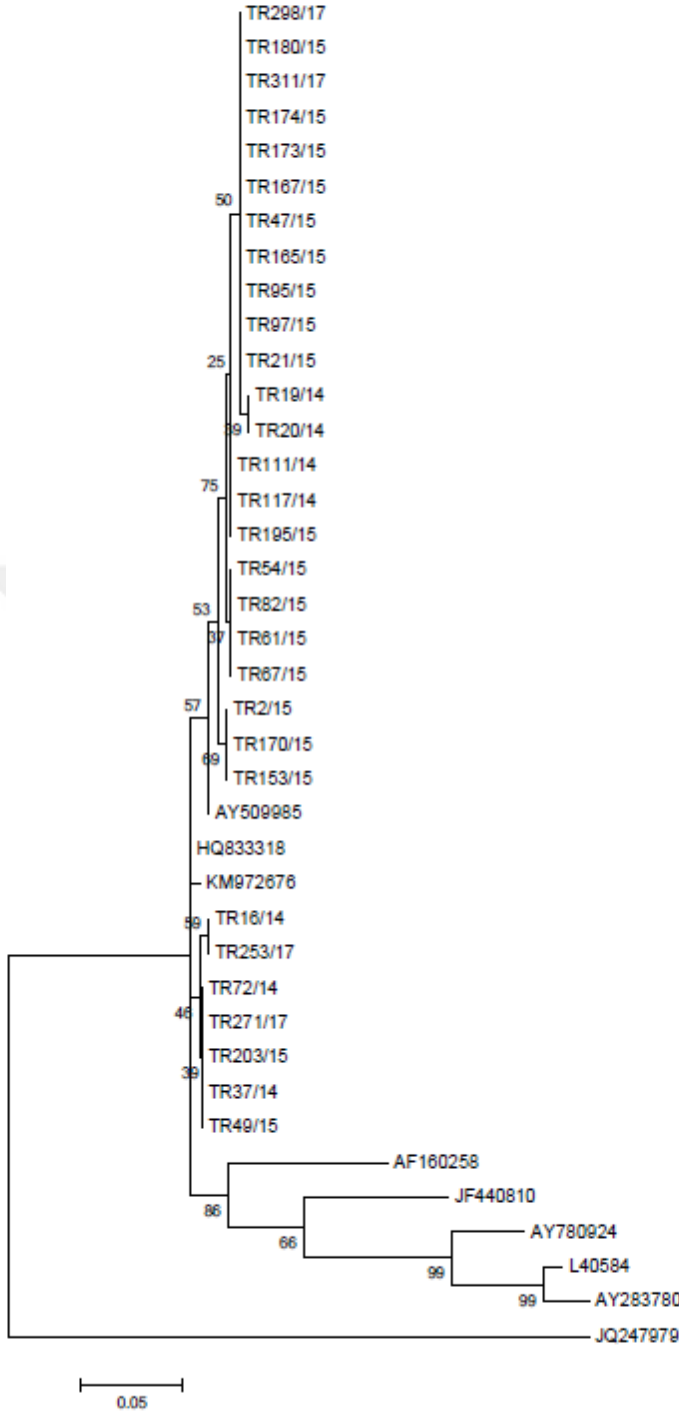
Şekil 10: VP2 gen bölgesi filogenetik ağacı

Genbank'ta kayıtlı olan KF914646 numaralı Türkiye izolatının, çalışmamızdaki 4 izolat hariç diğer izolatlarla yakın ilişkili olduğu görüldü. Bu dört izolattan üçü (TR21/15, TR95/15, TR170/15), İspanya (AJ489222) ve İran (GU338037) izolatlarına, TR16/14 izolatı ise Finlandiya (KR781007) ve İskoçya (AJ880294) izolatlarına çok benzer bulundu. Filogenetik analizde Türkiye'den izole

edilen IPN virüslerinin tamamının genogrup 5 (serotip A2- referans suş Sp) içinde yer aldığı görüldü. Yerel bir balık türü olan *Salmo trutta macrostigma*'dan izole edilen TR16/14 izolatının genetik olarak diğer izolatlardan farklılık gösterdiği belirlendi. Filogenetik ağacın birbirine çok yakın iki monofiletik grup oluşturduğu görüldü. Bu iki monofiletik grup dışında TR95/15 ve TR170/15 birarada küçük bir grup oluştururken TR16/14 ve TR21/15 farklı dallarda yer aldı. TR16/14 izolatı, Genbank'tan alınan Türkiye izolatları (KM972674- KM972675) ve Finlandiya, İskoçya ve Sp referans izolatı ile birlikte ayrı bir grup oluşturdu. Çalışmada kullanılan suşlar'dan Ege Bölgesi'nden elde edilen suşların genetik olarak kendi içersinde farklılık gösterdiği görüldü. Çalışmamızda elde edilen filogenetik ağaca göre izolatların coğrafik dağılımı ile filogenetik yakınlıkları arasında bir bağlantı tespit edilemedi.

4.9.2 VP5

Bu tez çalışmasında her bölgeyi temsil edecek şekilde seçilen 30 IPNV izolatı ile Genbank'tan alınan ve AF160258 (Tayvan), AY283780 (Japonya), L40584 (Kanada), JF440810 (ABD), AY780924 (İspanya), JQ247979 (Meksika), HQ833318 (Norveç), KM972676 (Türkiye), AY509985 (Avusturya) sekansları kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu (Şekil 11).



Şekil 11: VP5 gen bölgesi filogenetik ağacı

Genbank'ta kayıtlı olan AY509985 (Avusturya) izolatu çalışmamızda kullanılan izolatlarla çok yakın ilişkili olduğu görülürken, HQ833318 (Norveç) ve KM972676 (Türkiye) izolatlarının diğer yakın izolatlar olduğu belirlendi. Seçilen 30 IPNV izolatu filogenetik ağaçta birbirine çok yakın iki monofiletik grup oluşturdu. Genbank'ta kayıtlı AY509985 (Avusturya) izolatu monofiletik grup içinde yer

Tablo 11: VP2 gen bölgesi amino asit dizisi

^a Suş No	^b VP2 Gen Bölgesi Amino Asit Pozisyonları																															
	161	163	168	186	191	192	212	^c 217	219	^d 221	^e 247	248	252	254	255	257	276	282	285	286	301	303	306	316	319	321	323	328	354	361		
111	V	V	T	Q	A	K	R	P	I	T	E	R	N	T	K	H	S	N	Y	R	I	K	T	Q	V	D	V	A	A	Q		
97	
20	
72	
117	
165	
167	
174	
253	
298	
311	
2	F	F	S	
195	.	.	S	R	
21	.	.	.	R	S	A	Q	E	.	.	A	E		
67	.	.	.	R	
170	V	.	.	.	T	.	A	Q	D	.	R	.	.	D	.	G	.	.	.	A	.	.	T	.	.	.		
16	R	N	.	.	.	A	E	.	.	R	D	G	A	G	.	T	.	.	L		
95	T	.	A	Q	D	.	R	.	.	D	F	G	.	.	.	A	.	.	T	.	.	.		
173	Q	S	
49	R	I	.	.	.	
47	T	
61	
54	
153	
19	E	.	.	
37	I	.	
203	I	.	
82	I	.	
180	I	.	
271	I	.	
Sp	R	S	.	T	.	A	E	.	.	R	D	A	G	.	T	.	L		

^aTabloya sığması için suş kodlarından TR ve yıl kısmı çıkarılmıştır. ^bPoliprotein başlatıcı nükleotit baz alınarak hesaplanmıştır. ^{c-e}Sp serotipine göre virülens motiflerini göstermektedir (Santi ve ark., 2004; Song ve ark., 2005). Sp= Spjarup (AF342728).

4.10.2 VP5

Çoklu nükleotid ve amino asit karşılaştırmasında örneklerin birbirine çok yüksek oranda benzer olduğu görüldü. İzolatların nükleotid dizileri karşılaştırıldığında %97 ile %100 arasında benzerlik gösterdiği, amino asit benzerliğinin ise %100 olduğu tespit edildi. Bu çalışmada kullanılan 30 IPNV izolatu ve Genbank'ta kayıtlı AY509985 (Avusturya), HQ833318 (Norveç) ve KM972676 (Türkiye) izolatlarının aminoasit dizilimi yönünden homojen olduğu belirlendi (Tablo 12 ve Şekil 12).

201

228

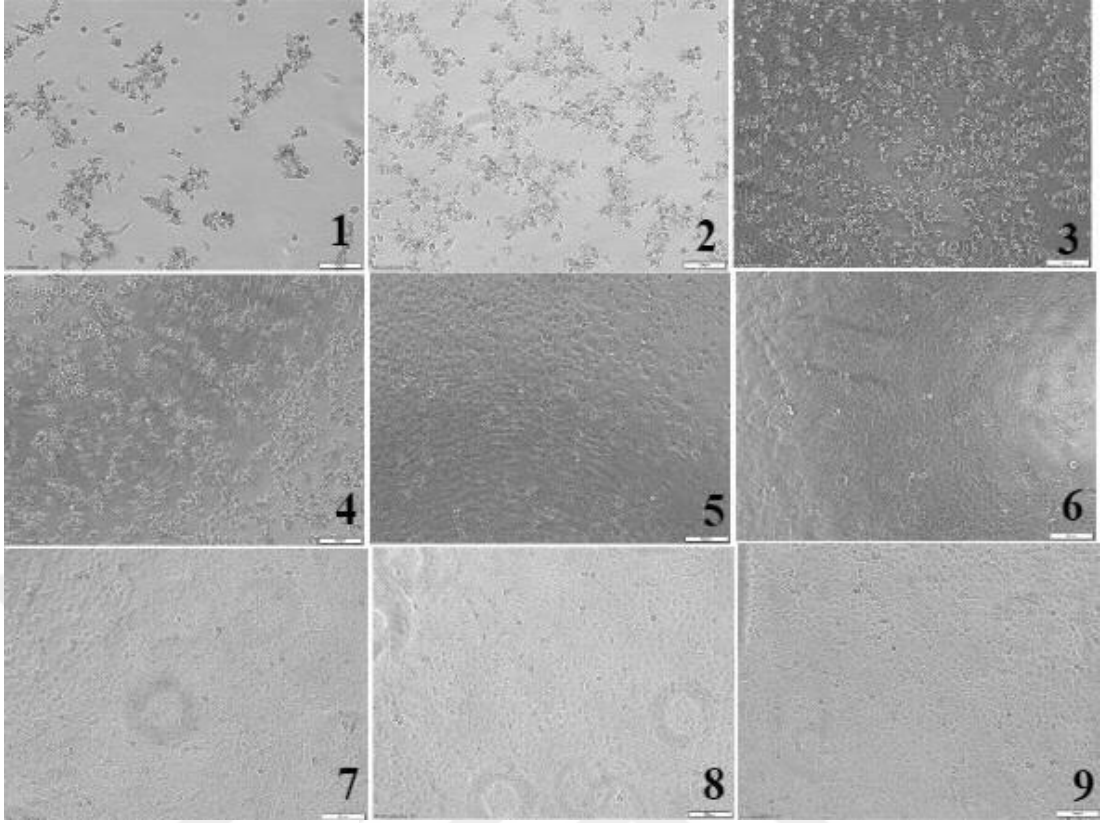
AF160258 (201)ACGGGAGGCTGGTATCCAGGAAATACGA
AY283780 (201)ACGGGAGCTGATCTCAGGAAATACGA
L40584 (201)ACGGGAGCTGATCTCAGGAAATACGA
JF440810 (201)ATGGGAGGCTATATCAAGGAAATACGA
AY780924 (201)ACGGGAGGTTGATCTCAGGAAATACGA
JQ247979 (201)GCGGAGGCGGATCTGAAAGAAATTCGC
HQ833318 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
KM972676(201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATATGA
AY509985 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR2/15 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR16/14 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR19/14 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR20/14 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR21/15 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR37/14 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR47/15 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR49/15 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR72/14 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR54/15 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR61/15 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR67/15 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR82/15 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR95/15 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR97/15 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR111/14 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR117/14 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR153/15 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR165/15 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR167/15 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR170/15 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR173/15 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR174/15 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR180/15 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR195/15 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR203/15 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR253/17 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR271/17 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR298/17 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA
TR311/17 (201)ACGGGAGGCTGATCTCAAGGAAATACGA

Species/Abbrv	Group Name	*****
1. AY509985		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
2. HQ833318		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
3. KM972676		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
4. TR2/15		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
5. TR16/14		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
6. TR19/14		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
7. TR54/15		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
8. TR82/15		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
9. TR97/15		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
10. TR95/15		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
11. TR111/14		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
12. TR16/14		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
13. TR271/17		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
14. TR165/15		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
15. TR47/15		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
16. TR167/15		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
17. TR170/15		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
18. TR173/15		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
19. TR117/14		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
20. TR174/15		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
21. TR195/15		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
22. TR203/15		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
23. TR153/15		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
24. TR253/17		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
25. TR20/14		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
26. TR61/15		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
27. TR67/15		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
28. TR311/17		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
29. TR298/17		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
30. TR37/14		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
31. TR49/15		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
32. TR180/15		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY
33. TR21/15		TERHILKQETSSYNLEVSESGSGILVCFPGAPGSRIGAHYRWNANQTGLEFDQWLETSQDLKKAFN YGRLISRKY

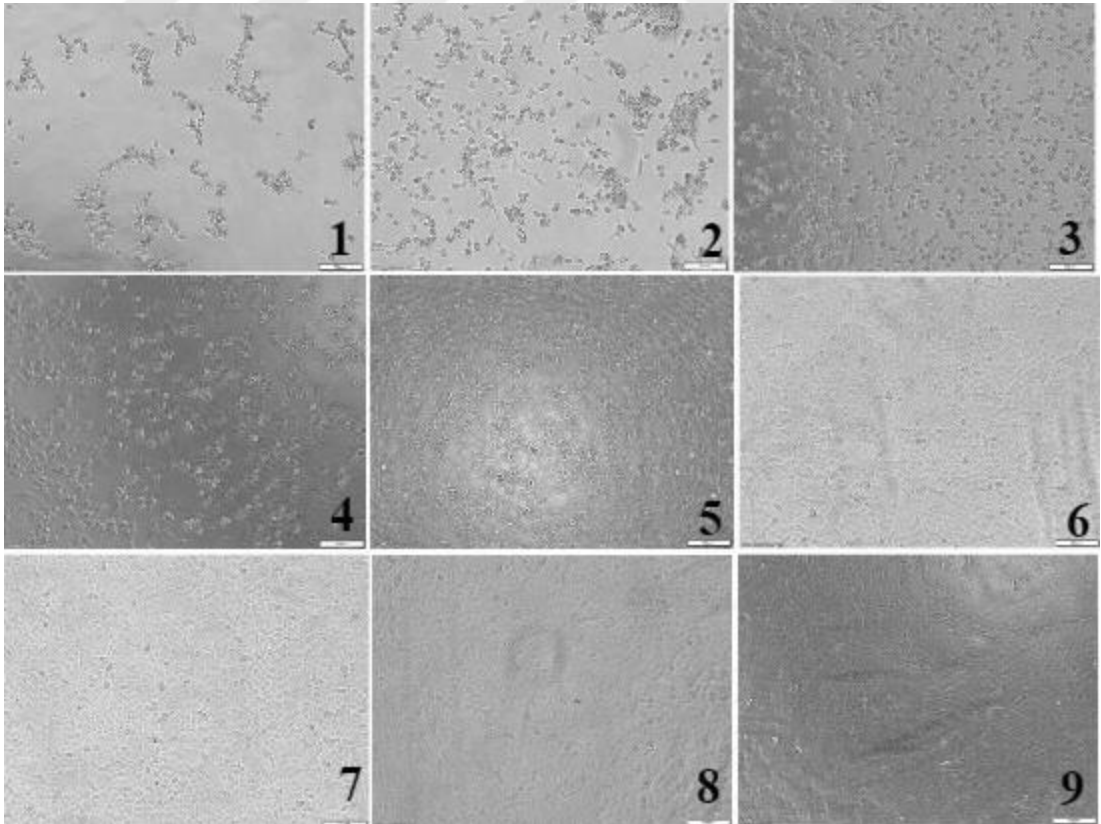
Şekil 12: VP5 gen bölgesi amino asit dizisi

4.11 TCID₅₀ Hesaplanması

TCID₅₀ dozunun hesaplanmasında kullanılmak üzere VP2 gen bölgesi filogenetik ağacında ve aminoasit diziliminde birbirinden farklılık gösteren 2 IPNV izolatu seçildi. Seçilen izolatlardan TR16/14 en son 10⁻³'te, TR82/15 ise 10⁻⁴ dilüsyonlarında CPE gösterdi. Spearman & Kärber algoritmasına göre hesaplanan TCID₅₀ dozu TR16/14 için 10^{-3,9}(Şekil 13); TR82/15'te (Şekil 14) ise 10^{-5,2} bulundu.



Şekil 13: TR16/14 TCID₅₀ Hesaplanması



Şekil 14: TR82/15 TCID₅₀ Hesaplanması

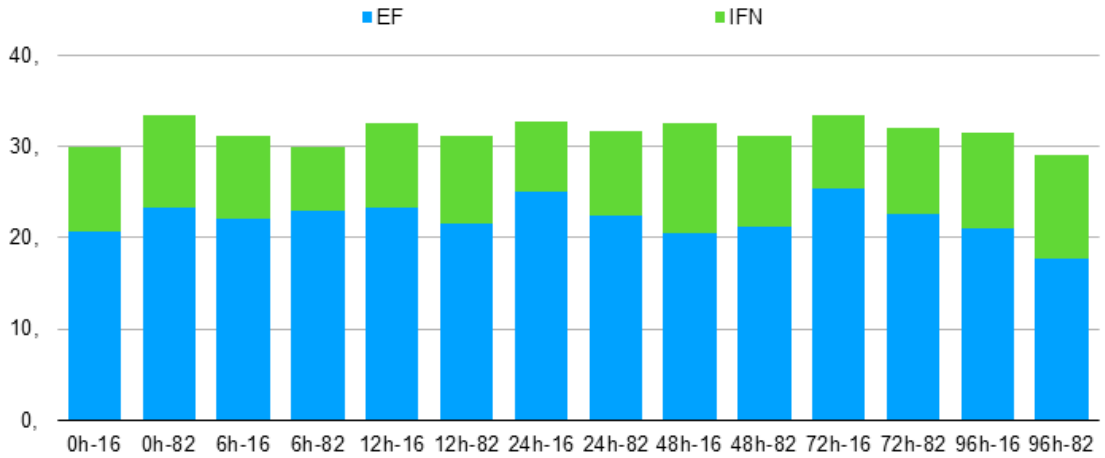
4.12 Hücresel İmmün Yanıt Ölçüm Sonuçları

Yapılan RT-qPCR sonuçlarına göre TR16/14 ve TR82/15 suşlarının TO hücre hattında IFN, Mx ve Vip immün gen uyarımları arasında önemli bir fark bulunamadı.

IFN immün gen uyarımına bakıldığında; TR16/14 suşunun 24. saatte, TR82/15 suşunun ise 6. saatte pik yaptığı görüldü. Suşların pik yaptığı saate kadar gen uyarımlarının arttığı, pik yapmış oldukları saatlerden sonra ise değişimin düşük seviyede olduğu görüldü (Tablo 13 ve Şekil 15).

Tablo 13: Saatlere göre IFN ve EF gen uyarımı RT-qPCR Ct değerleri

Saat	EF	IFN
0h-16	20,77	29,93
0h-82	23,31	33,36
6h-16	22,12	31,24
6h-82	22,93	30
12h-16	23,34	32,54
12h-82	21,63	31,25
24h-16	25,04	32,69
24h-82	22,48	31,67
48h-16	20,44	32,59
48h-82	21,13	31,21
72h-16	25,46	33,45
72h-82	22,55	32,04
96h-16	21,06	31,59
96h-82	17,78	29,12

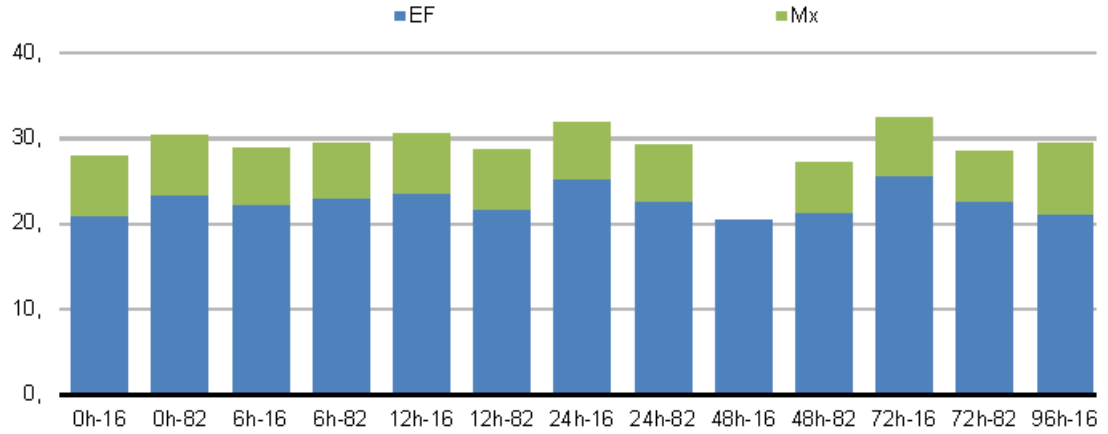


Şekil 15: Saatlere göre IFN ve EF gen uyarımı grafiği

Mx immun gen uyarımına bakıldığında; TR16/14 suşunun 6. saatte, TR82/15 suşunun ise 96. saatte pik yaptığı görüldü. Her iki suşun da gen uyarımlarında saat farklılıklarına göre düzenli bir artış veya azalma olmadığı görüldü. TR16/14 suşunun 48. saatte sonuç vermediği görüldü (Tablo 14 ve Şekil 16).

Tablo 14: Saatlere göre Mx ve EF gen uyarımı RT-qPCR Ct değerleri

Saat	EF	Mx
0h-16	20,77	27,86
0h-82	23,31	30,42
6h-16	22,12	28,80
6h-82	22,93	29,46
12h-16	23,34	30,56
12h-82	21,63	28,69
24h-16	25,04	31,81
24h-82	22,48	29,25
48h-16	20,44	No Ct
48h-82	21,13	27,20
72h-16	25,46	32,47
72h-82	22,55	28,48
96h-16	21,06	29,32
96h-82	17,78	23,40

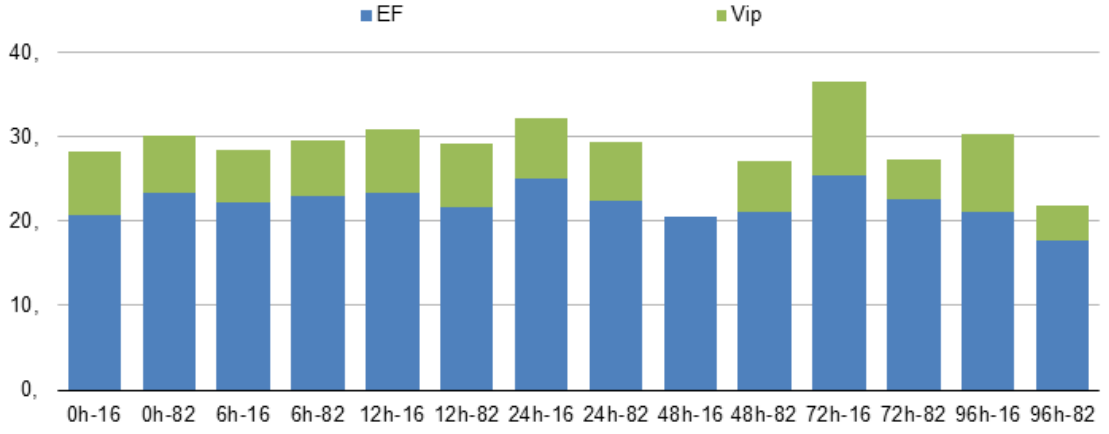


Şekil 16: Saatlere göre Mx ve EF gen uyarımı grafiği

Vip immun gen uyarımına bakıldığında; TR16/14 suşunun düzensiz bir artış-azalış göstermesiyle birlikte 6. saatte pik yaptığı görülürken, TR82/15 suşunun 12. saat hariç düzenli artış göstererek 96. saatte pik yaptığı görüldü. Bu çalışmada da TR16/14 suşu 48. saatte sonuç vermedi (Tablo 14, şekil 17).

Tablo 15: Saatlere göre Vip ve EF gen uyarımı RT-qPCR Ct değerleri

Saat	EF	Vip
0h-16	20,77	28,27
0h-82	23,31	30,06
6h-16	22,12	28,36
6h-82	22,93	29,5
12h-16	23,34	30,85
12h-82	21,63	29,14
24h-16	25,04	32,1
24h-82	22,48	29,29
48h-16	20,44	No Ct
48h-82	21,13	27,1
72h-16	25,46	32,13
72h-82	22,55	27,28
96h-16	21,06	30,36
96h-82	17,78	21,54



Şekil 17: Saatlere göre Vip ve EF gen uyarımı grafiği

5 TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1 Tartışma

Bu tez çalışmasında ülkemizin altı farklı bölgesinde bulunan (Marmara, İç Anadolu, Doğu Anadolu, Ege ve Karadeniz) gökkuşuğu alabalığı (*O. mykiss*) işletmelerinde IPNV, IHNV ve VHSV'nin tespitine yönelik çalışmalar yapıldı. Yapılan çalışmalarda VHSV ve IHNV'ye rastlanmazken IPNV'nin tüm bölgelerde yaygın olduğu belirlendi. IPNV'nin prevalansının İç Anadolu'da %30,26; Ege'de %27,53; Akdeniz'de %26,25; Doğu Anadolu'da %25,37; Marmara'da %25 ve Karadeniz'de %11,23; ülke genelinde ise %27,14 olduğu tespit edildi. İç Anadolu, Ege, Akdeniz, Marmara ve Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki prevalans değerlerinin birbirine yakın olduğu görülürken Karadeniz Bölgesi'ndeki prevalansın düşük olmasının bu bölgede taşıyıcılığın yüksek olmasından kaynaklandığını düşündürdü.

Daha önce yapılan araştırmalarda IPN hastalığının en çok yavru balıklarda görüldüğü rapor edilmişti (Wolf, 1988). Yaptığımız çalışmada 1 g'ın altındaki balıkların %41,09 oranında IPNV ile enfekte olduğu görülürken, enfeksiyonun 1-5 g arası balıklarda %17,8; 5-20 g arası balıklarda %10,54 ve 20-300 g arası balıklarda ise %9,67 olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar IPNV konusunda yapılan daha önceki çalışmaları destekledi.

Literatürde bildirilen klinik belirtilere benzer olarak bu tez çalışmasında da en sık rastlanan klinik belirtilerin renkte koyulaşma, ekzoftalmus ve asites olduğu görüldü (Noga, 1996; Wolf, 1988; Yasutake,1975). IPNV'nin özellikle yavru gökkuşuğu alabalıklarında (*O. mykiss*) %70'e varan mortaliteye sebep olabildiği; kümülatif mortalitenin virüs suşuna, virüs dozuna ve su sıcaklığı gibi çevresel faktörlere bağlı olarak %10 ile %90 arasında değiştiği kaydedildi (Bebak-Williams ve ark., 2002; Bebak ve McAllister, 2009; McAllister ve Owens, 1995; Roberts ve Pearson, 2005; Wolf ve ark., 1960). Bu tez çalışmasında da yukarıda belirtilen çalışmalara paralel olarak IPNV kaynaklı mortalite oranının %30- %40 arasında

değiştigi, bakteriyel etkenlerle miks seyreden olgularda ve yoğun stres koşullarında mortalitenin %70'e ulaştığı gözlemlendi.

Bu çalışma, ülkemizde alabalık işletmelerinde sadece IPNV'nin yaygın olduğunu ve örnekleme yapılan işletmelerin VHSV, IHNV'den ari olduğunu ortaya koydu.

Danimarka'da 1968 yılında gökkuşuğu alabalıklarından (*O. mykiss*) izole edilen ve Sp serotipi olarak adlandırılan IPNV suşunun diğer serotiplere göre Avrupa ve Asya'da daha yaygın olduğu rapor edildi (Blake ve ark., 2001; Jorgense ve Bregnbal, 1969; Nishizawa ve ark., 2005; Romero-Brey ve ark., 2009; Mutoloki ve Evensen, 2011). Bu tez çalışmasında da, örnekleme yapılan tüm bölgeleri temsilen seçilen 30 adet IPNV izolatının tamamının genogrup 5 içerisinde yer aldığı ve Sp serotipine yakın profilde olduğu görüldü. Ülkemizde yapılan diğer bir çalışmada da Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki gökkuşuğu alabalıklarından (*O. mykiss*) izole edilen 11 adet IPNV suşunun, VP2/NS kavşak bölgesi sekans sonuçlarına göre genogrup 5'e ait olduğunu tespit edildi (Oğut ve ark., 2013). Her iki çalışmada farklı gen bölgeleri çalışılmasına rağmen uyumlu sonuçlar elde edildi. Türkiye'de Bornova Veteriner Araştırma Enstitüsü tarafından 2004-2011 tarihleri arasında izole edilen 112 adet IPNV izolatından 38 tanesi de Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı olan *Danish Institute for Food and Veterinary Research* tarafından Sp serotipi olarak serotiplendirildi (Kalaycı ve ark., 2012).

Bu tezde yapılan filogenetik analiz sonucunda, izolatlar arasındaki farklılıklarla, izolatların coğrafi dağılımı üzerine bir bağlantı saptanamadı. Örneğin Ege Bölgesi'nden elde edilen izolatların sekans analizlerinde %96 oranında benzerlik olduğu görülürken, TR170/15 izolatı haricinde diğer bölgelerden elde edilen izolatların coğrafi farklılıklara rağmen kendi aralarında %98-100 oranında benzerlik sergilediği görüldü. Bu sonuçlara göre filogenetik ağaçta izolatların büyük çoğunluğunun tek bir monofiletik grupta yer alması, ülke genelinde ortak bir gen havuzundan gelen baskın bir varyantın olduğunu düşündürdü. Ülkemizde farklı bölgelerden izole edilen IPNV suşlarının genetik olarak homojen olması, işletmeler arasında yapılan yumurta ve yavru balık transferleriyle ilişkili olabileceği kanısını uyandırdı.

Yapılan araştırmalar, IPNV enfeksiyonunun çok geniş bir coğrafyada yaygın görülmesinin nedenini, ülkeler arası yapılan virüsle enfekte yumurta ve yavru balık alışverişi olduğunu göstermektedir. Mutloki ve Evensen (2011) şili’de Atlantik somonlardan izole edilen IPNV’nin Norveç izolatlarıyla yakın ilişkili olduğunu ve bunun Norveç’ten ithal edilen yumurta ve yavrulardan kaynaklandığını ne sürdüler. Bu tez çalışmasında kullanılan IPNV suşları arasında genetik olarak en fazla farklılık gösteren suşun yerel bir alabalık türü olan *Salmo trutta macrostigma*’dan izole edilen TR16/14 olduğu görüldü. Bu suşun, İskoçya’da gökkuşağı alabalıklarından (*O. mykiss*) ve Finlandiya’da Atlantik somonlardan (*S. salar*) izole edilen suşlara bu çalışmadaki diğer 29 suşa oranla genetik olarak daha yakın olduğu belirlendi. Ayrıca alışmamızda filogenetik ağaçta elde edilen monofiletik grup dışında yer alan TR21/15, TR95/15 ve TR170/15 suşlarının, İspanya ve İnan’daki gökkuşağı alabalıklarından (*O. mykiss*) izole edilen suşlara çok yakın genetik benzerlik gösterdiği tespit edildi. Elde edilen sonuçlar ülkemizde gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) işletmelerinden izole edilen IPNV suşlarının İskoçya, Finlandiya, İspanya ve İnan suşlarıyla yakın benzerlik gösterdiğini ve bu durumun adı geçen ülkelerle ülkemiz arasında yapılan yumurta veya yavru balık alışverişiyle ilgili olabileceğini gösterdi.

IPN salgınlarına bağlı mortalitedeki değişkenliğin nedenini belirlemek amacıyla yapılan genomik dizileme çalışmalarında IPNV’nin virülens varyasyonu ortaya konuldu (Blake ve ark., 2001 ve Santi ve ark., 2004). Ayrıca belirtilen çalışmalarda, VP2 ve VP5 gen bölgelerinin genomik dizilerinde farklılıklar olduğu ve bu farklılıkların IPNV suşlarının virülensinin belirlenmesinde önemli olduğu bildirildi.

Frost ve ark., (1995); VP2 gen bölgesinde yer alan 199., 217., 221., 247., 286., 500. amino asit pozisyonlarındaki farklılıkların mortalite oranına etki ettiğini, Santi ve ark., (2004) ise virülensinin belirlenmesinde 217., 221. ve 247. aminoasit pozisyonlarının önemli olduğunu rapor etti. Bu konuda son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise;

- 217. amino asit pozisyonunda Treonin, 221.’de Alanin (T₂₁₇A₂₂₁) taşıyan suşların yüksek virülent,

- 217. amino asit pozisyonunda Prolin, 221.'de Alanin (P₂₁₇A₂₂₁) taşıyan suşların orta düzeyde virüent,
- 217. amino asit pozisyonunda Treonin, 221.'de Treonin (T₂₁₇T₂₂₁) veya 217. amino asit pozisyonunda Prolin ve 221.'de Treonin (P₂₁₇T₂₂₁) taşıyan suşların ise düşük/avirüent

olduğu bildirildi (Santi ve ark., 2004; 2005; Song ve ark., 2005; Bain ve ark., 2008; Julin ve ark., 2013). Ancak Gadan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; zamanla virülensle ilişkili amino asit pozisyonlarında şekillenen mutasyonlara bağlı olarak avirüent suşların virüent hale geçebildiği kaydedildi (Gadan ve ark., 2013).

Bu çalışmada; 30 IPNV suşundan 8'inin VP2 bölgesindeki amino asit diziliminin %100 benzer olduğu tespit edildi. Geriye kalan suşlardan TR61/15 ve TR54/15'in kendi aralarında, TR37/14, TR203/15, TR82/15, TR180/15 ve TR271/17 suşlarının ise birbirleri arasında %100 benzer olduğu saptandı. Monofiletik grup dışında kalan 4 suşun ise amino asit dizilimi bakımından monofiletik gruptaki suşlardan daha yüksek oranda farklılık gösterdiği tespit edildi.

Santi ve ark. (2004) çalışmalarında 221. pozisyondaki amino asitin virülense direkt etki ettiğini ve bu pozisyonda Alanin bulunuyorsa virüsün yüksek virüent olduğunu bildirdi. Bu tez çalışmasında sekans analizi yapılan 30 suşun tamamında 217. ve 221. amino asit pozisyonlarında sırasıyla Prolin ve Treonin olduğu tespit edildi. Bu amino asit dizilimindeki suşların düşük veya avirüent suşlar olduğu rapor edildi (Santi ve ark., 2004, Song ve ark., 2005). Bunun yanı sıra Santi ve ark. (2004) 221. pozisyonunda Alanin amino asiti bulunan yüksek virüent IPNV'lerin hücre kültüründe seri pasajı takiben virülensini kaybederek Treonin amino asitine dönüştüğünü rapor etti. Bu tezin sekans analizi çalışmalarında kullanılan viral RNA'lar direkt dokudan izole edildiğinden Santi ve ark. (2004) tarafından 221. amino asit pozisyonun hücre pasajından dolayı virülensini kaybetmiş olması söz konusu değildir. Yapılan bu çalışmalara göre tezimizde çalışılan Türkiye suşlarının düşük veya avirüent suşlar olduğu görülse de sahada %30-40 oranında mortalite olduğu kaydedildi. Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde yapılan bazı çalışmalarda da IPN salgılarından sorumlu izolatların düşük veya virüent olmayan motifleri barındırdığı rapor edildi (Eriksson-Kallio ve ark., 2016; Ruane, McCarthy ve ark., 2009, Salgado-Miranda ve ark., 2014). Aradaki farklılığa Santi ve ark. 2004 ve Song

ve ark., (2005)'nin çalışmalarında bizim çalışmamızdan farklı olarak gökkuşağı alabalıklarından (*O. mykiss*) değil Atlantik somon (*S. salar*) balıklarından izole edilen suşların kullanılmasının neden olduğu ileri sürülebilir. Bunun yanı sıra virüs genomunda virülense etki eden başka bölgelerin olabileceği düşünülmektedir. Bunlara ilaveten Song ve ark., (2005) VP2 bölgesindeki 221. amino asit pozisyonunun persiste enfeksiyonla ilişkili olduğunu ve bu pozisyonda treonin bulunan suşlarla enfekt edilen balıkların tamamında persiste enfeksiyon oluştuğunu bildirdi. Bu çalışmaya göre ülkemizdeki suşların persiste enfeksiyona neden olduğu, çevresel stress faktörleriyle birlikte mortalite oluşturduğu ileri sürülebilir.

IPNV'nin VP5 gen bölgesi konakçı hücrede antiapoptoz yolunu düzenlemektedir (Hong ve ark., 2002). Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda VP5 proteininin başlangıç kodonunda varyasyonların bulunduğu ve bunun genotiplendirmede kullanılabileceği ortaya koyuldu (Magyar ve Dobos, 1994; Heppell ve ark., 1995; Weber ve ark., 2001; Shivappa ve ark., 2004; Davies ve ark., 2010). Santi ve ark. 2004 yılında yayınladıkları çalışmada A segmentinin nükleotid sekansında en çok varyasyon bulunan bölgenin VP2 daha sonra da VP5 olduğunu belirtti. Hong ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada VP5'in antiapoptotik etkisi olduğunu bildirirken Santi ve ark. (2005) ise yaptıkları *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda VP5'in antiapoptotik etkilerine rastlamadıklarını bildirdi. Araştırmacılar tarafından bu durumun, her iki çalışmada kullanılan virüs suşlarının farklı olmasına bağlı olabileceği ve ileri çalışmalara gerek duyulduğu sonucuna varıldı. Bu farklılık da VP5 gen bölgesinin sekans çalışmalarının önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Seçtiğimiz 30 adet IPNV suşunun VP5 gen bölgesinin çoklu nükleotid ve amino asit karşılaştırmasında örneklerin birbirleriyle çok yüksek oranda benzer olduğu görüldü. Sekans analiziyle yapılan karşılaştırmalarda; nükleotid dizisindeki benzerliğin %97 ile %100, amino asit benzerliğinin ise %100 olduğu görüldü. Bunların yanı sıra bu çalışmada kullanılan 30 izolatın Genbank'ta kayıtlı olan AY509985 (Avusturya), HQ833318 (Norveç) ve KM972676 (Türkiye) izolatlarıyla amino asit dizilimi yönünden %100 benzer olduğu belirlendi. Bu sonuçlar; ülkemiz izolatlarının VP5 gen bölgesine göre genotiplendirilmesinin anlamlı olmadığını gösterdi. Santi ve ark. IPNV'nin tüm genomuna sekans analizi yaptıkları çalışmada VP2 gen bölgesi gibi VP5'in de virülenste etkili olabileceğini bildirdi. Bu çalışmada kullanılan IPNV

izolatlarının VP5 gen bölgesi amino asit diziliminin %100 benzer olması suşlar arasında virülens farklılığının VP5 gen bölgesinden kaynaklanmamış olabileceğini gösterdi. IPNV konusunda bu güne kadar yapılan çalışmalarda VP5 gen bölgesi üzerinde virülense direkt etki eden spesifik amino asit motiflerinin bildirilmemiş olması bu konuda daha ileri çalışmalar yapılması gerektiği sonucuna ulaştırdı.

İmmun gen uyarımın ölçülmesi amacıyla seçilen iki IPNV suşu TO hücre hattına ekilerek 0., 6., 12., 24., 48.,72. ve 96. saatlerde IFN, Mx ve Vip genlerinin uyarımı RT-qPCR ile ölçüldü. Elde edilen sonuçlara göre her iki suşun da belirtilen immün genleri uyardığı saptandı. Suşlar arasındaki immün gen uyarımlarının farklı saatlerde pik yaptığı görüldü. Çalışmada kullanılan IPNV suşları arasında immün gen uyarımı açısından anlamlı bir fark bulunamadı.

5.2 Sonuç

Bu tez çalışmasında;

- IPNV'nin Türkiye çapında yaygın ve prevalansını %27.14 olduğu,
- Ülkemiz IPNV izolatlarının genogrup 5'te yer aldığı,
- IPNV izolatlarının genetik farklılıkları ile coğrafi kökenleri arasında bir korelasyon olmadığı,
- VP2 gen bölgesinin amino asit analizinde P₂₁₇T₂₂₁ motifine sahip olması nedeniyle IPNV izolatlarının düşük virüent/avirüent olduğu,
- VP5 gen bölgesindeki amino asit diziliminin %100 benzer olduğu sonucuna varılmıştır.

6 KAYNAKLAR

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (2000) Cellular and Molecular Immunology, 4th edition. W.B Saunders Company, United States of America.
- Abbas YM, Pichlmair A, Gorna MW et al (2013) Structural basis for viral 5'-PPP-RNA recognition by human IFIT proteins. *Nature*, 494, 60-64.
- Acosta F, Petrie A, Lockhart K et al (2005) Kinetics of Mx expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to VHS–DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol* 18: 81-89.
- Adair BM, Ferguson, HW (1981) Isolation of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus from nonsalmonid fish. *Journal of Fish Diseases*, 46976.
- Agius C, Manganwiryo H, Johnson RH et al (1982) A more sensitive technique for isolating infectious pancreatic necrosis virus from asymptomatic carrier rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases*, 5 285-292.
- Ahne W (1985) Viral infection cycles in pike (*Esox lucius* L.) *Z. Angew. Ichthyol.* 2: 90-91.
- Ahne W, Negele R (1985) Studies on the transmission of infectious pancreatic necrosis virus via eyed eggs and sexual products of salmonid fish. *Fish and Shellfish Pathology*, 262–70.
- Akova SB (2015) Aquaculture and its distribution in Turkey. *J Aquacult Eng Fish Res*, 1, 160-190.
- Alonso MF, Coll JM (1999) Induced fusion of VHSV persistently infected fish cells. *Journal of Fish Diseases* (22), 401-406.
- Alonso MF, Kim CH, Johnson MC et al (2004) The NV of Snakehead Rhabdovirus (SHRV) Is Not Required for Pathogenesis, and a Heterologous Glycoprotein Can Be Incorporate into the SHRV Envelope. *Journal of Virology* (78), 5875-5882.
- Amend DE (1970) Approved procedure for determining absence of infectious hematopoietic necrosis (IHN) in salmonid fishes. U.S. Fish Wildl. Serv., Fish Dis. Leaflet No. 31. Washington, DC. 4.
- Amend DE (1974) Infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus disease. U.S. Fish Wildl. Serv., Fish Dis. Leaflet No. 39. Washington, DC. 6.
- Amend DE (1975) Detection and transmission of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout. *J. Wildlife Dis.* 11: 471-478.
- Amend DE, Pietsch TP (1972) Virucidal activity of two iodophores to salmonid viruses. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 29: 61-65.
- Amend DE, Wood JW (1972) Survey for infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus in Washington salmon. *Prog. Fish-Cult.* 34: 143-147.
- Amend DE, Yasutake WT, Fryer JL et al (1973) Infectious hematopoietic necrosis (IHN). EIFAC Technical paper 17, Suppl. 2:80-98.
- Amend DE, Yasutake WT, Mead RM (1969) A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 98: 796-804.
- Amlacher E, Ude J, Rudolph C et al (1980) Direct Electron Microscopical Visualization of The Presumptive Virus of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) in

Rainbow Trout *Salmo gairdneri* Richardson and Additional Histopathological and Haematological Observations. *Journal of Fish Diseases*, 3, 55–62.

Bain N, Gregory A, Raynard RS (2008) Genetic Analysis of Infectious Pancreatic Necrosis Virus from Scotland. *Journal of Fish Diseases*, 31, 37–47.

Batts WN, Winton JR (1989) Enhanced detection of infectious hematopoietic necrosis virus and other fish viruses by pretreatment of cell monolayers with polyethylen glykol. *J. Aquatic Anim. Health* 1: 284–290.

Baudin Laurencin F (1987) IHN in France. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 7:104.

Bebak J, McAllister PE (2009) Continuous exposure to infectious pancreatic necrosis virus during early life stages of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 32: 173–81.

Bebak-Williams J, McAllister PE, Smith G et al (2002) Effect of fish density and number of infectious fish on the survival of rainbow trout fry, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during epidemics of infectious pancreatic necrosis. *Journal of Fish Diseases* 25: 715–26.

Bernard J, De Kinkelin P, Bearzotti-Le BM (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.

Besse P (1955) Recherche sur L'étiologie de L'anémie Infectieuse de la Truite, *Bulletin de L'Académie Vétérinaire de France*, 5, 194–198.

Betts AM, Stone DM. (2001). Rescue of viral haemorrhagic septicaemia virus minigenomes by helper virus. *Virus Research* (77), 19–23.

Biacchesi S, Béarzotti M, Bouguyon E et al (2002) Heterologous Exchanges of the Glycoprotein and the Matrix Protein in a Novirhabdovirus. *Journal of Virology* (76), 2881–2889.

Biacchesi S, Thoulouze MI, Béarzotti M et al (2000). Recovery of NV Knockout Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Expressing Foreign Genes. *Journal of Virology* (74), 11247–11253.

Biering E, Villoing S, Sommerset I et al (2005) Update on viral vaccines for fish. *Dev. Biol.*, 12197113.

Blake S, Ma J, Caporale D et al (2001) Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Dis. Aquat. Org.* 45: 89–102.

Blake SL, Schill WB, McAllister PE et al (1995) Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. *J Clin Microbiol.*, 33, 835–839.

Bootland LM, Leong JC (1999) Infectious hematopoietic necrosis virus. In: *Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*, Woo P.T.K. & Bruno D.W., eds. CAB International, Oxon, UK, 57–121.

Bovo G, Giorgetti G, Jørgensen PEV et al (1987) Infectious haematopoietic necrosis: first detection in Italy. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 7:124.

Bowers RM, Lapatra SE, Dhar AK (2008) Detection and quantitation of Infectious Pancreatic Necrosis Virus by Real-Time Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction using lethal and non-lethal tissue sampling. *J. Virol. Methods.* 147,226–234.

Brey IR, Bandin I, Cutrin JM et al (2009) Genetic Analysis of Aquabirnaviruses Isolated from Wild Fish Reveals Occurrence of Natural Reassortment of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Journal of Fish Diseases*, 32, 585–595.

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.

Bullock GL, Rucker RR, Amend D et al (1976) Infectious pancreatic necrosis transmission with iodine-treated and nontreated eggs of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). J Fish Res Board Can 33: 1197–8.

Çağırğan H, Tanrıkuş TT, Tokşen E (1996) Yüksek ve Orta Virülensli Virüslerin Neden Olduğu Enfeksiyonlar. Vet. Kontr. ve Araşt. Enst. Md. Derg. C 20, 34.

Campbell JB, Wolf K (1969) Plaque Assay and Some Characteristics of Egtved Virus (Virus of Viral Hemorrhagic Septicemia of Rainbow Trout), Can. Journal of Microbiology, 15, 635–637.

Candan A (2002) First report on the diagnosis of infectious pancreatic necrosis (IPN) based on reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in Turkey. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 22(1)45-48.

Caswell-Reno P, Lipipun V, Reno P et al (1989) Use of a group-reactive and other monoclonal antibodies in an Enzyme Immunodot Assay for identification and presumptive serotyping of Aquatic Birnaviruses. J. Clin.Microbiol. 27, 1924–1929.

Caswell-Reno P, Reno PW, Nicholson BL (1986) Monoclonal antibodies to infectious pancreatic necrosis virus analysis of viral epitopes and comparison of different isolates. J.Gen. Virol., 67 21932205.

Center for Food Security and Public Health (CFSPH), 2007. Viral Hemorrhagic Septicemia, Institute for International Cooperation in Animal Biologics and Collage of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa, 4.

Chin KC, Cresswell P (2001) Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. Proc Natl Acad Sci U S A, 98, 15125-15130.

Christie KE, Havarstein LS, Djupvik HO et al (1988) Characterization of a new serotype of infectious pancreatic necrosis virus isolated from Norwegian Atlantic salmon. Arch. Virol. 103: 167.

Christie KE, Ness S, Djupvik HO (1990) Infectious pancreatic necrosis virus in Norway: partial serotyping by monoclonal antibodies. J Fish Dis 13:323–327.

Cohen J (1975) Ribonucleic-Acid Polymerase-Activity in Purified Infectious Pancreatic Necrosis Virus of Trout. Biochemical and Biophysical Research Communications 62(3), 689-695.

Cortez-San M, Villanueva M, Jashes RA et al (2009) Molecular characterization of IPNV RNA replication intermediates during the viral infective cycle. Virus Res 144, 344–349.

Crane M, Hardy-Smith P, Williams LM et al (2000) First isolation of an Aquatic Birnavirus from Farmed and Wild Fish Species in Australia. Dis.Aquat. Org. 43, 1–14.

Cupit PM, Lorenzen N, Strachan G et al (2001) Neutralisation and binding of VHS virus by monovalent antibody fragments. Virus Research (81), 47-56.

Cutrin JM, Barja JL, Nicholson BL et al (2004) Restriction Fragment Length Polymorphisms and Sequence Analysis: An Approach for Genotyping Infectious Pancreatic Necrosis Virus Reference Strains and Other Aquabirnaviruses Isolated from Northwestern Spain. Applied and Environmental Microbiology, 70, 2, 1059-1067.

Cutrin JM, Lopez Vazquez C, Oliveira JG et al (2005) Isolation in cell culture and detection by PCR based technology of IPNV-like virus from leucocytes of carrier turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). Journal of Fish Diseases, 28 713722.

Das B, Collet B, Snow M et al (2007) Expression kinetics of ISG15 and viral major capsid protein (VP2) in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) fry following infection with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Fish Shellfish Immunol. 23,825–830.

Davies KR, McColl KA, Wang LF et al (2010) Molecular characterisation of Australian isolates of Aquabirnavirus. Dis. Aquat. Org. 93, 1–15.

De Kinkelin P, Scherrer R (1970) Le Virus d'Egtved I. Stabilite, Development et Structure du Virus de la Souche Danoise F1. Annual Research Veterinary, 1, 17–30.

De Kinkelin P, Bearzotti-Le BM, 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.

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.

De las Heras AI, Jean SRS, Prieto SIP (2008) Salmonid fish viruses and cell interactions at early steps of the infective cycle. Journal of Fish Diseases. J Fish Diseases 37: 535-546.

De las Heras AI, Saint-Jean SR, Perez-Prieto SI (2008) Salmonid fish viruses and cell interactions at early steps of the infective cycle. Journal of Fish Diseases 31(7), 535-546.

Değirmenci U, Nemli E, Çağırğan H (2008) Türkiye'nin değişik bölgelerinden infeksiyöz pankreatik necrosis virüsü izolasyonu. I. Ulusal Alabalık Sempozyumu, 14-16 Ekim, Isparta, 35.

Dixon PF, Hill BJ (1983) Rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). J.gen.Virol., 64 321330.

Dixon, PF, Hill BJ (1983) Inactivation of infectious pancreatic necrosis virus for vaccine use. J. Fish Dis. 6, 399-409.

Dobos P (1976) Size and structure of the genome of infectious pancreatic necrosis virus. Nucleic Acids Res, 3(8): p. 1903-24.

Dobos P (1977) Virus specific protein synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. Journal of Virology, 21242258.

Dobos P (1995a) The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Annual Review of Fish Diseases, 5, 25-54.

Dobos P, Rowe D (1977) Peptide map comparison of infectious pancreatic necrosis virus-specific polypeptides. Journal of Virology 24, 805–820.

Dobos, P (1995b). Protein-primed RNA synthesis in vitro by the virion-associated RNA polymerase of infectious pancreatic necrosis virus. Virology 208, 19-25.

Dopazo CP, Barja JL (2002) Diagnosis and identification of IPNV in salmonids by molecular methods. Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases, 2348.

Dorson M, Torchy C (1985) Experimental transmission of infectious pancreatic necrosis virus via the sexual products. Fish and Shellfish Pathology, 251–61.

Duncan R, Dobos P (1986) The nucleotide sequence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) dsRNA segment A reveals one large ORF encoding a precursor polyprotein. Nucleic Acids Res 14, 5934.

- Duncan R, Mason CL, Nagy E (1991) Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: a putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. *Virology*, 181(2), 541-52.
- Duncan R, Nagy E, Krell PJ et al (1987) Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus- encoded protease, and fine structure mapping of genome segment A coding regions. *J Virol* 61, 3655–3664.
- Einer-Jensen K, Ahrens P, Forsberg R et al (2004) Evolution of The Fish Rhabdovirus Viral Hemorrhagic Septisemia Virus. *Journal of General Virology*, 85, 1167– 1179.
- Einer-Jensen K, Ahrens P, Lorenzen N (2005) Parallel phylogentic analyses using the N, G or Nv gene from a fixed group of VHSV isolates reveal the same overall genetic typing. *Diseases of Aquatic Organisms*, 67:39-45.
- Elsayed E, Faisal M, Thomas M et al (2006) Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from muskellunge, *Esox masquinongy* (Mitchill), in Lake St Clair, Michigan, USA reveals a new sublineage of the North American genotype. *Journal of Fish Disease* (29), 611-619.
- Engelking HM, Harry JB, Leong JC (1991) Comparison of representative strains of IHN virus by serological neutralisation and cross-protection assays, *Applied Environment Microbiology* 57: 1372- 1378.
- Enzmann PJ, Dangschat H, Feneis B et al (1992) Demonstration of IHN virus in Germany. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 12:185.
- Enzmann PJ, Fichtner D, Schütze H et al (1998) Development of vaccines against VHS and IHN oral application, molecular marker and discrimination of vaccinated fish from infected populations. *J. Appl. Ichthyol.* 14: 179-183. *Journal of Applied Ichthyology* (14), 179-183.
- Enzmann PJ, Konrad M (1985) Inapparent Infections of Brown Trout with VHS-Virus. *Bulletin of The European Association of Fish Pathologists*, 5, 81–83.
- Everett H, McFadden G (1999) Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends in Microbiology*. 7(4): 160-165.
- Fabregas J, García D, Alonso MF et al (1999) In vitro inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae. *Ant. Antiviral Research* (44) 67-73.
- Fasial M, Ahne W (1980) Use of immunoperoxidase technique for detection of fish virus antigens. In; *Fish Diseases*. (Ahne, W., ed.) Third COPRAQ Session. Springer-Verlag, New York.
- Finlay J, Hill BJ (1975) The use of the complement fixation test for rapid typing of infectious pancreatic necrosis virus. *Aquaculture* 5: 305-310.
- Fisheries Research Services (FRS) (2006) Risks to Wild Freshwater Fisheries from Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) Disease. Scottish Executive Environment and Rural Affairs Department.
- Frantsi C, Savan M (1971) Infectious Pancreatic necrosis Virus Temperature and Age Factors in Mortality. *Journal of Wildlife Diseases* 7: 249-255.
- Frost P, Håvarstein LS, Lygren B et al (1995) Mapping of neutralization epitopes on infectious pancreatic necrosis viruses. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 5), 1165–117.
- Gadan K, Sandtro A, Marjara IS (2013) Stress-induced reversion to virulence of infectious pancreatic necrosis virus in naive fry of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PLoS ONE* 8, 2, 1-12.

Gastric J, De Kinkelin P (1980) Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson reared in sea-water. *Journal of Fish Diseases* 3, 21-27.

Gastric J, de Kinkelin P (1984) Experimental Study of The Susceptibility of Two Marine Fish Species, Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*), to Viral Haemorrhagic Septicemia, *Aquaculture*, 41, 203–212.

Gastric J, De Kinkelin P (1984) Experimental study of the susceptibility of two marine fish species sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) to viral hemorrhagic septicemia. *Aquaculture* 41: 203-212.

Ghittino P (1965) Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) in Rainbow Trout in Italy, *Annual N. Y. Academic Sciences*, 126, 468–478.

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü İhbarı Mecburi Hayvan Hastalıkları Listesi, (2007).

Goodwin EA, Peterson EJ, Meyers R et al (2004) Transmission of Exotic Fish Viruses: The Relative Risks of Wild and Cultured Bait. *American Fisheries Society, Fisheries*, 29, 5, 19–23.

Graham DA, Staples C, Wilson CJ et al (2007) Biophysical properties of salmonid alphaviruses influence of temperature and pH on virus survival. *Journal of Fish Diseases* (30), 533-543.

Granzow H, Weiland F, Fichtner D et al (1997) Studies of the ultrastructure and morphogenesis of fish pathogenic viruses grown in cell culture. *Journal of Fish Diseases* 20(1), 1-10.

Grischkowsky, RS, Amend DE (1976) Infectious hematopoietic necrosis virus: Prevalence in certain Alaskan sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. *J. Fish. Res. Board Can.* 33: 186-188.

Grove S, Austbo L, Hodneland K et al (2013) Immune parameters correlating with reduced susceptibility to pancreas disease in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Fish shellfish Immunol.* 34 (3) 789-798.

Guenther RW, Watson SW, Rucker R R (1959) Etiology of sockeye salmon “virus” disease. *U S Fish Wildl Serv Spec Sci Rep Fish* 296, 1–10.

Hasobe M, Saneyoshi M (1985) On the approach to the viral chemotherapy against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in vitro and in vivo on salmonid fishes. *Fish Pathol.* 20: 343-351.

Havarstein LS, Kalland KH, Christie KE et al (1990) Sequence of the large double-stranded RNA segment of the N1 strain of infectious pancreatic necrosis virus: a comparison with other Birnaviridae. *J Gen Virol* 71, 299–308.

Henryon M, Berg P, Olesen NJ et al (2005) Selective breeding provides an approach to increase resistance of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) to the diseases, enteric redmouth disease, rainbow trout fry syndrome, and viral haemorrhagic septicaemia. *Aquaculture* (250), 621-636.

Henryon M, Jokumsen A, Berg P et al (2002) Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout. *Aquaculture* (209), 59–76.

Heppell J, Tarrab E, Lecomte J et al (1995). Strain variability and localization of important epitopes on the major structural protein (VP2) of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 214, 40-49.

Hershberger PK, Gregg J, Pacheco C et al (2007) Larval Pacific herring, *Clupea pallasii* (Valenciennes), are highly susceptible to viral hemorrhagic septicemia and

survivors are partially protected after their metamorphosis to juveniles. *Journal of Fish Diseases* (30), 445-458.

Hershberger PK, Kocan RM, Elder NE (1999) Epizootiology of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus in Pacific Herring from The Spawn- On-Kelp Fishery in Prince William Sound, Alaska, USA, *Diseases of Aquatic Organisms*, 37, 23–31.

Hetrick FM, Fryer JL, Knittel MD (1979) Effect of water temperature on the infection of rainbow-trout *Salmo gairdneri* Richardson with infectious hematopoietic necrosis virus. *J Fish Dis* 2:253–257.

Hill BJ (1977) Present status of IPN virus. International symposium on diseases of cultured salmonids. Tavolek, Inc., Seattle, Washington, April 4-6, 1977, 116-119.

Hill BJ, Way K (1995) Serological Classification Of Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) Virus And Other Aquatic Birnaviruses. *Annual Review of Fish Diseases*, Vol 5, 55- 77.

Hillis DM, Bull JJ (1993) An empirical-test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42, 182-192.

Hong JR, Gong HY, Wu JL (2002) IPNV VP5, a novel antiapoptosis gene of the Bcl-2 family, regulates Mcl-1 and viral protein expression. *Virology* 295, 217–229.

Hopper K (1989) The Isolation of VHSV from Chinook Salmon at Glenwood Springs, Orcas Island, Washington. *Fisheries Society Fish Health Section Newsettler*, 17, 1.

Hsu YL, Chiang SY, Lin ST et al (1989) The specific detection of infectious pancreatic necrosis virus in infected cells and fish by the immunodot blot method. *J.Fish Dis.* 12: 561-571.

<https://talk.ictvonline.org/> (2017).

Huang C, Chien MS, Landolt M et al (1994) Characterization of the infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein using neutralizing monoclonal antibodies. *Dis. Aquat. Org.*, 18, 29–35.

Hudson EB, Bucke D, Forrest A (1981) Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from eels, *Anguilla anguilla* L. United Kingdom, *Journal of Fish Diseases*, 4 429-431.

Hungnes O, Jonassen TO, Jonassen CM et al(2000) Molecular epidemiology of viral infections - How sequence information helps us understand the evolution and dissemination of viruses. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 108, 81-97.

Işıdan H, Bolat YA (2011) Survey of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) in Turkey. *Turk. J. Fish Aquat. Sci.*, 11: 507-513.

Isshiki T, Nishizawa T, Kobayashi T et al (2001) An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis Aquat Org* 47: 87–99.

Jensen KE, Winton J, Lorenzen N (2005) Genotyping of the fish rhabdovirus, viral haemorrhagic septicaemia virus, by restriction fragment length polymorphisms. *Veterinary Microbiology* (106), 167–178.

Jensen MH (1963) Preparation of Fish Tissue Cultures for Virus Research. *Bulletin de L'Office International des Epizootes*, 59, 131–134.

Jensen NJ, Bloch B, Larsen JL (1979) The Ulcus-Syndrome in Cod (*Gadus morhua*) III, A Preliminary Virological Report, *Nordisk Veterinærmedicin*, 34, 136–142.

Jorgensen P, Bregnbal F (1969) Infectious Pancreatic Necrosis in Rainbow Trout (*Salmo Gairdneri*) in Denmark. *Nordisk Veterinær Medicin*, 21(3): 142.

- Jørgensen PEV (1974) A Study of Viral Diseases in Danish Rainbow Trout, Their Diagnosis and Control, PhD Thesis, Danish Royal Vet. and Agri. Univ., Copenhagen, 101.
- 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. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Jørgensen PEV (1982) Egtved Virus: Occurrence of Inapparent Infections with Virulent Virus in Free-Living Rainbow Trout, *Salmo gairdneri* Richardson, at Low Temperatures, Journal of Fish Diseases, 5, 251–255.
- Jørgensen PEV, Olesen NJ (1987) Cod Ulcer Syndrom Rhabdovirus is Indistinguishable from The Egtved (VHS) Virus. Bulletin of The European Association of Fish Pathologists, 7, 73–74.
- Julin K, Mennen S, Sommer AI (2013) Study of Virulence in Field Isolates of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Obtained from the Northern Part of Norway. Journal of Fish Diseases, 36, 89-102.
- 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. Bull. Eur. Ass. Fish Path., 26, 4, 157-162.
- Kalaycı G, İncöğlü Ş, Özkan Özyer B et al (2012) Türkiye’de İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis ve Viral Hemorajik Septisemi Hastalıklarının Durumu, Bornova Vet. Bil. Derg., 34 (48): 31-38.
- Kärber G (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Archiv f experiment Pathol u Pharmakol, 162: 480-483 [DOI: 10.1007/BF01863914].
- Kehlet NP (1973) A Summary of The Rules, Methods and Results of The Danish Campaign Against Infectious Disease of Freshwater Fish, EIFAC (Eur. Inland Fish. Advis. Comm.) Tech. Pap.17, 2, 37–38.
- Kim WS, Oh MJ, Nishizawa T et al (2007) Genotyping of Korean isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. Arch. Virol., 152, 2119–2124.
- Kimura T, Yoshimizu M, Yasuda H (1984) Rapid, simple serological diagnosis of infectious pancreatic necrosis by coagglutination test using antibody sensitized staphylococci. Fish Pathology, 19(1) 25-33.
- Knott RM, Munro ALS (1986) The persistence of infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon. Vet. Immunol. Immunopathol., 12: 359-364.
- Kurath G (2008) Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. Rev Sci Tech Int Epiz;27: 175–96.
- Kurath G, Garver KA, Troyer RM et al (2003) Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in North America. J. Gen. Virol., 84, 803–814.
- Kurita J, Lida Y, Nakajima K et al (2002) Virucidal Effects of Various Disinfectants on Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) Isolated. Fish Pathol 37: 175-181.
- Kurth, J, Waldmaan R, Heith J et al (1999) Efficient Inactivation of Viruses and Mycoplasma in Animal Sera Using UVC Irradiation, Dev. Biol. Stand., 99, 111–118.
- Kuznar J, Soler M, Farias G et al (1995) Attachment and Entry of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (Ipnv) into Chse-214 Cells. Archives of Virology 140(10), 1833-1840.

- La Patra SE, Roberti KA, Rohovec JS et al (1989) Fluorescent antibody test for the rapid diagnosis of infectious hematopoietic necrosis. *J. Aquatic Anim. Health* 1: 29-36.
- Labus MB, Breeman S, Ellis AE et al (2001) Antigenic comparison of a truncated form of VP2 of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus expressed in four different cell types. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 203–216.
- Lam K (1997) Morphological evidence of apoptosis in chickens infected with infectious bursal disease virus. *J. Comp. Pathol.*, 116, pp. 367-377.
- Lannan, CN, Winton JR, Fryer JL (1984) Fish cell lines: Establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro.* Vol. 20, no. 9.
- Larsen R, Rokenes TP, Robertsen B (2004) Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by atlantic salmon Mx1 protein *Journal of Virology*, 78 (15) 7938-7944.
- Le Berre M, De Kinkelin P, Metzger A (1977) Identification serologique des rhabdovirus des salmonides. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 87: 391-393.
- Lee MK, Blake S, Singer J et al (1996). Genomic variation of aquatic birnaviruses based on restriction fragment length polymorphisms (RFLP). *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2513-2520.
- Leong JC, Alonso M, Leisy D et al (2001) Genetic Vaccines for Aquaculture. ARS-OI Biotechnology Aquaculture Workshop.
- Leong JC, Brown D, Dobos P et al (2000) Family Birnaviridae. In *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 481–490. Edited by M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle & R. B. Wickner. San Diego, CA: Academic Press.
- Liao L, Dobos P (1995) Mapping of a serotype specific epitope of the major capsid protein VP2 of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 209, 684–687.
- Lidgerding BC (1981) Cell lines used for the production of viral fish disease agents. *International symposium on fish biologics serodiagnostics and vaccines*, Leetown, W. Va., U.S.A., *Develop. biol. standard*, 49233241.
- Lopez Lastra M, Gonzalez M, Jashes M et al (1994) A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription (RT) polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Fish Diseases*, 17, 269-282.
- Lopez-Vazques C, Bain N, Olveira JG et al (2002) Characterization of VHSV Isolates from Iberian Origin and from The Flemish Cap by Sequencing. 11th International Conference of The EAAP on Diseases of Fish and Shellfish, st. Julians, Malta, Abstract Book, 138, September 2002.
- Lorenzen N, LaPatra SE (2005) DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev Sci Tech OIE*; 24: 201–13.
- Løvoll M, Austbo L, Jorgensen JB et al (2011) Transcription of reference genes used for quantitative RT-PCR in Atlantic salmon is affected by viral infection. *Veterinary Research* 42, 8.
- MacDonald RD, Dobos P (1981) Identification of the proteins encoded by each genome segment of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 114, 414–422.
- Mackelvie RM, Desautels D (1975) Fish viruses-survival and inactivation of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Res. Bd. Can.* 32: 1267-1273.

Magyar G, Dobos P (1994) Evidence for the detection of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein and the 17-kDa polypeptide in infected cells and of the NS protease in purified virus. *Virology*, 204, 580–589.

Manning DS, Leong JC (1990) Expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*, 179, 16–25.

Manning DS, Mason CL, Leong JC (1990). Cell-free translational analysis of the processing of infectious pancreatic necrosis virus polyprotein. *Virology*, 179, 9–15.

Maraver AA, Ona F, Abaitua D et al (2003) The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J Virol*, 77(11): p. 6438-49.

McAllister PE (1979) Fish Viruses and Viral Infections. *Comprehensive Virology*, 14, 401–470.

McAllister PE (1990) Fish Disease Leaflet 83: Viral Hemorrhagic Septicemia of Fishes. US Fish and Wildlife Service. National Fisheries Research Center-Leetown. National Fish Health Research Laboratory, Kesrneysville, West Virginia.

McAllister PE (1993) Salmonid Fish Viruses In: Fish Medicine. (Stoskopf, M. K. Ed.) W. B. Saunders Company. Pp. 380-408.

McAllister PE, Bebak J (1997) Infectious pancreatic necrosis virus in the environment relationship to effluent from aquaculture facilities. *Journal of Fish Diseases*, 20 201-207.

McAllister PE, Owens WJ (1986) Infectious pancreatic necrosis virus: protocol for a standard challenge to brook trout. *Transactions of the American Fisheries Society* 115:466–470.

McAllister PE, Owens WJ (1987) Identification of three serotypes of viral hemorrhagic septicemia virus by immunoblot assay using antiserum to serotype F1. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 7: 90-92.

McAllister PE, Schill WB (1986) Immunoblot assay: A rapid and sensitive method for identification of salmonid fish viruses. *J. Wildlife Dis.* 22: 468-474.

McBeath AJ, Collet B, Paley R et al (2006) Identification of an interferon antagonist protein encoded by segment 7 of infectious salmon anaemia virus. *Virus Res.* 115, 176–184.

McGonigle R (1941) Acute catarrhal enteritis of salmonid fingerlings. *Trans AM Fish Soc*, 70:297–303.

McLauchlan PE, Collet B, Ingerslev E et al (2003) DNA vaccination against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in rainbow trout: size, dose, route of injection and duration of protection—early protection correlates with Mx expression. *Fish & Shellfish Immunol* 15: 39–50.

Meier W, Schmitt M, Wahli T (1994) Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) of Nonsalmonids. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 4, 359–373.

Meier W, Vestergard-Jorgensen PE (1980) Isolation of VHS virus from pike fry (*Esox lucius*) with haemorrhagic symptoms. In: Fish Diseases, ed. W. Ahne, *Proceedings in Life Sciences*, Berlin: Springer Verlag, 8-17.

Melby H, Christie K (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.

Meyers TR, Short S, Lipson K et al (1994) Association of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus with Epizootic Hemorrhages of The Skin Pacific Herring (*Clupea*

harengus pallasii) from Prince William Sound and Kodiak Island, Alaska, USA, Disease of Aquatic Organisms, 19, 27–37. 30.

Mikalsen AB, Torgersen J, Alestrom P et al (2004) Protection of atlantic salmon *Salmo salar* against infectious pancreatic necrosis after DNA vaccination. Dis Aquat Org; 60(July 1):11–20.

Miller KM, Withler RE (1998) The salmonid class I MHC: Limited diversity in a primitive teleost. Immunol. Rev. 166: 279–293.

Moon C, Do J, Cha S et al (2004) Comparison of the immunogenicity of recombinant VP2 and VP3 of infectious pancreatic necrosis virus and marine birnavirus. Arch. Virol. 149, 2059–2068.

Mortensen HF, Heuer OE, Lorenzen N et al (1999) Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. Virus Research (63), 95–106.

Mulcahy D (1981) Detection of infectious hematopoietic necrosis virus in salmon ovarian fluid is related to stage of ripeness and sampling time within run. U.S. Fish Wildl. Serv., Res. Inf. Bull. No. 81-B. Bethesda, MD. 1.

Mulcahy D, Fryer JL (1976) Double infection of rainbow trout fry with IHN and IPN viruses. Am. Fish. Soc./Fish Health Sect. Newsl. 5(1): 5-6.

Munro ES, Midtlyng PJ (2011) Fish Diseases and Disorders: Viral. Bact. Fungal Infect. 3, 1.

Mutoloki S, Evensen Ø (2011) Sequence similarities of the capsid gene of Chilean and European isolates of Infectious Pancreatic Necrosis Virus point towards a common origin. J. Gen. Virol. 92, 1721–1726.

Neukirch M (1985) Uptake, multiplication, and excretion of viral haemorrhagic septicaemia virus in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Fish and Shellfish Pathology, Ellis A.E., ed. Academic Press, Inc., USA, 295–300.

Nicholson BL (1993) Use of monoclonal antibodies in identification and characterization of fish viruses. Annu. Rev. Fish Dis. 3, 241–257.

Nicholson BL, Caswell P (1982) Enzyme-Linked immunosorbent assay for identification of infectious of infectious pancreatic necrosis virus. J. Clin. Microbiol. 16: 469- 472.

Nishizawa T, Iida H, Takano R et al (2002) Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) based on partial G and P genes. Disease of Aquatic Organisms (48), 143-148.

Nishizawa T, Kinoshita S, Kim WS et al (2006) Nucleotide diversity of Japanese isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. Dis. Aquat. Org., 71, 267-272, 46.

Nishizawa T, Kinoshita S, Yoshimizu M (2005) An approach for genogrouping of Japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogroup, VII, based on the VP2/NS junction region J. Gen. Virol. 86, 1973-1978.

Nishizawa T, Savaş H, Işıdan H et al (2006) Genotyping and Pathogenicity of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus from Free-Living Turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish Coastal Area of the Black Sea. Applied and Environmental Microbiology (72), 2373-2378.

Noga EJ (1996) Fish Disease Diagnosis and Treatment,. MosbyYear Book, Inc. 11830 Westline Industrial Drive St. Louis, Missouri, 208-211.

Novoa B, Toranzo AE, Dopazo CP (1993) Isolation of IPN virus serotype VR299 from turbot in Europe. Diseases of Aquatic Organisms, 176-165.

- Nygaard R, Husgard S, Sommer AI et al (2000) Induction of Mx protein by interferon and double-stranded RNA in salmonid cells. *Fish Shellfish Immunol*, 10, 435-450.
- OIE (World Organisation for Animal Health) (2006) Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases.
- OIE (World Organisation for Animal Health) (2016) Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases.
- Olesen, N (1998) Sanitation of viral haemorrhagic septicaemia (VHS). *Journal of Applied Ichthyology* (14), 173-177.
- Ooi EL, Verjan N, Haraguchi I et al (2008) Innate immunomodulation with recombinant interferon-alpha enhances resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to infectious hematopoietic necrosis virus. *Dev Comp Immunol*, 32, 1211-1220.
- Ørpetveit I, Mikalsen AB, Sindre H et al (2010) Detection of infectious pancreatic necrosis virus in subclinically infected Atlantic salmon by virus isolation in cell culture or real-time reverse transcription polymerase chain reaction: influence of sample preservation and storage. *J Vet Diagn Invest* 22: 886–895.
- Parisot TJ, Yasutake WT, Bresler V (1963) A new geographic and host record for infectious pancreatic necrosis. *Trans American Fisheries Society*. 91, 63-6.
- Peter F, Neukirch M (1986) Transmission of Some Fish Pathogenic Viruses by The Heron, *Ardea cinerea*. *Journal of Fish Diseases*, 9, 539–544.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29.
- Pliszka F (1946) Anamia zarazliwa pstragow (*Anemia infectiosa truttae*). *Medycyna Weterynaryjna* 2, 133-140.
- Quillet E, Dorson M, Le Guillou S et al (2007) Wide range of susceptibility to rhabdoviruses in homozygous clones of rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology* (22), 510-519.
- Rasmussen CJ (1965) A Biological Study of The Egtved Disease (INUL), *Annals of The New York Academy of Sciences*, 126, 427–460.
- Reinertsen H, Haaland H. (1995) Sustainable Fish Farming. A.A. Balkema, Rotterdam, 307.
- Ristow SS, Arnzen De Avila JM (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. *Dis. Aquat. Org.*, 11, 105–115.
- Roberts RJ (2001). *Fish pathology*. Bailliere Tindall, London. Virology pp. 238-243, 386-387
- Roberts RJ, Pearson MD (2005) Infectious Pancreatic Necrosis in Atlantic Salmon, *Salmo salar*. *Fish Dis*; 28(July 7):383–90.
- Robertsen B (2008) Expression of interferon and interferon-induced genes in salmonids in response to virus infection, interferon-inducing compounds and vaccination. *Fish Shellfish Immunol*. 25, 351–357
- Robertsen B, Bergan V, Rokenes T et al (2003) Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *J. Interferon Cytokine Res*. 23, 601–612.

- Robertsen B, Trobridge G, Leong J (1997) Molecular cloning of the double-stranded RNA inducible Mx genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*L.). *Dev Comp Immunol*, 21, 397-412.
- Robertsen, B (2006) The interferon system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol*. 20, 172–191.
- Rocha A, Ruiz S, Tafalla C et al (2004) Characterisation of the syncytia formed by VHS salmonid rhabdovirus G gene transfected cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (99), 143–152.
- Romero-Brey I, Bandin I, Cutrin J et al (2009) Genetic analysis of aquabirnaviruses isolated from wild fish reveals occurrence of natural reassortment of infectious pancreatic necrosis virus. *J. FishDis.* 32, 585–595.
- Ruane N, McCarthy L, Swords D et al (2009) Molecular differentiation of Infectious Pancreatic Necrosis Virus isolates from farmed and wild salmonids in Ireland. *J. Fish Dis.* 32, 979–987.
- Rucker RR, Whippel WJ, Parvin JR et al (1953) A contagious disease of salmon possibly of virus origin. *Fish Bull Fish Wildl Serv US* 54:35–46.
- Sadler AJ, Williams BR (2008) Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 559-568.
- Sadler AJ, Williams BR (2008) Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol*, 8, 559-568.
- Sanjuan ML, Yus E, Simarro I et al (1994) Infectious pancreatic necrosis virus from brown trout (*Salmo trutta*) and atlantic salmon (*Salmo salar*) with high mortality in Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 14 (1): 5-7.
- Sano M, Okamoto N, Fukuda H et al (1992) Virulence of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Is Associated with the Larger RNA Segment (RNA Segment-A). *Journal of Fish Diseases*, 15(4): p. 283-293. 45.
- Santi N, Song H, Vakharia VN (2005) Infectious Pancreatic Necrosis Virus VP5 is Dispensable for Virulence and Persistence. *Journal of Virology*, 79, 14, 9206-9216.
- Santi N, Vakharia VN, Evensen O (2004) Identification of Putative Motifs Involved in the Virulence of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Virology*, 322, 31-40.
- Sanz F, Coll J (1992) Techniques for diagnosing viral diseases of salmonid fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 13 211-223.
- Schäperclaus W (1938) Die Schädigungen der Deutschen Fischerei Durch Fischparasiten und Fischkrankheiten, *Fischerei Zeitung*, 22, 1–20.
- Schäperclaus W (1954) Undersøgelse af Sygdom hos Ørredernei Danske ørreddambrug og Forslag til Bakæmpelse Heraf, *Ferskvandsfiskeribladet*, 52, 145–149.
- Schlotfeldt HJ (1979) Infectious pancreatic necrosis (IPN) salmonids part 1 Aetiology, epizootiology and control, *Tierärztliche Umschau*, 34 539-546.
- Schultz CL, McAllister PE, Schill WB (1989) Detection of infectious hematopoietic necrosis virus in cell culture fluid using immunoblot assay and biotinylated monoclonal antibody. *Dis. Aquat. Org.* 7, 31-37.
- Schutze H, Mundt E, Mettenleiter TC (1999) Complete Genomic Sequence of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus, a Fish Rhabdovirus. *Virus Genes*, 19, 59–65.
- Sen GC (2001) Viruses and interferons. *Annu. Rev. Microbiol.* 283, 255–281.
- Shivappa RB, Song H, Yao K et al (2004) Molecular characterization of Sp serotype strains of infectious pancreatic necrosis virus exhibiting differences in virulence. *Dis*

- Aquat Organ, 61(1-2): 23-32. 46.SIAS (Sequences Identities and Similarities) (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>).
- Silim A, Elazhary ASY, Lagace (1982) Susceptibility of trouts of different species and origins to various isolates of infectious pancreatic necrosis virus. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 158C-1584.
- 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. *Journal of Fish Diseases* (27), 401-408.
- Skall HF, Olesen NJ, Mellergaard S (2005) Viral Hemorrhagic Septicemia Virus in Marine Fish and Its Implications for Fish Farming- A Review. *Journal of Fish Diseases*, 28, 509–529. 31.
- Slierendrecht WJ, Olesen NJ, Madsen HRJ et al (2001) Rainbow trout offspring with different resistance to viral haemorrhagic septicaemia. *Fish & Shellfish Immunology* (11), 155–167.
- Smail DA (1995) Isolation and Identification of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) Virus from North Sea Cod (*Gadus morhua* L.). ICES CM 1995/F: 15.
- Smail DA (2000) Isolation and Identification of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) Viruses from Cod (*Gadus morhua*) with The Ulcus Syndrome and from Haddock (*Melenogrammus aeglefinus*) Having Skin Hemorrhages in The North Sea. *Diseases of Aquatic Organisms*, 41, 231–235.
- Smail DA, Bruno DW, Dear G (1992). Infectious pancreatic necrosis (IPN) virus Sp serotype in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., postsmolts associated with mortality and clinical disease. *J. Fish Dis.* 15: 77.
- Smail DM, Munro ALS (1989) *The Virology of Teleost in Fish Pathology*. Edited by R.J Roberts. Bailliera Tindall, 2428 Oval Road, London NW1 7DX, England, 216226.
- Smirnov YA, Kapitulets SP, Amitina NN et al (1991) Effect of UV Irridation on Rotavirus, *Acta. Virol.*, 35, 1–6.
- Snow M, Bain N, Black J et al (2004) Genetic population structure of marine viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 61:11-21.
- Snow M, Cunninham CO, Melvin WT et al (1999) Analyses of The Nucleoprotein Gene Identifies Distinct Lineages of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus within The European Marine Environment. *Virus Research*, 63, 35–44.
- Snow M, King JA, Garden A et al (2005) Experimental susceptibility of Atlantic cod, *Gadus morhua* (L.), and Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), to different genotypes of viral hemorrhagic septicemia virus. *Journal of Fish*, 28(12):737–742.
- Song H, Santi N, Evensen O et al (2005) Molecular determinants of Infectious Pancreatic Necrosis Virus virulence and cell Culture Adaptation. *J. Virol.* 79, 10289–10299.
- Spearman C (1908) The Method of “Right and Wrong Cases” (Constant Stimuli) without Gauss’s Formula. *Br J Psychol*, 2: 227-242 [DOI: 10.1037/h0063767]
- Svingerud T, Solstad T, Sun B et al (2012) Atlantic salmon type I IFN subtypes show differences in antiviral activity and cell-dependent expression: evidence for high IFNb/IFNc-producing cells in fish lymphoid tissues. *J. Immunol.*, 189, 5912-5923.
- Swanson RN, Gillespie JH (1981) An indirect fluorescent antibody test for the rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus in tissues. *J. Fish Dis.* 4: 309-315.

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*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* (62), 359-366.

Tafalla C, Novoa B. (2001). Respiratory burst of turbot (*Scophthalmus maximus*) macrophages in response to experimental infection with viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Fish & Shellfish Immunology* (11), 727-734.

Takeuchi O, Akira S (2007) Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol Rev*, 220, 214-224.

Takeuchi O, Akira S (2007) Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol. Rev.*, 220, 214-224.

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. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 21, 214-19.

Taksdal T, Stangeland K, Dannevig B (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.*, pp. 39-44.

Tamura K, Stecher G, Peterson D et al (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.

Tan Z, Komar C, Enright WJ (2006) Health management practices for sustainability. 2nd International Symposium on Cage Aquaculture in Asia (CAA2), 3-8 July, 5-7.

Tanimura N, Sharma JM (1998) In-situ apoptosis in chickens infected with infectious bursal disease virus. *J. Comp. Pathol.*, 118, 15-27.

Tarab E, Berthiaume L, Grothe S et al (1995) Evidence of a major neutralizable conformational epitope region of VP2 of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of General Virology*, 76, 551-558.

Tarab E, Berthiaume L, Heppell J (1993) Antigenic characterization of serotype 'A' of infectious pancreatic necrosis virus with three panels of monoclonal antibodies. *Journal of General Virology*, 74, 2025-2030.

The Virus Species Concept (ICTV) (2000) Introduction Virus Taxonomy Online: Report of The International Committee on Taxonomy of Viruses.

Thoulouze MI, Bouguyon E, Carpentier C et al (2003) Essential Role of the NV protein of Novirhabdovirus for Pathogenicity in Rainbow trout. *Journal of Virology* (78), 4098-4107.

Thrusfield M (2007) *Veterinary Epidemiology, Assaying Antibodies*, Singapur: Blackwell Publishing, 307- 308.

Timur G, Timur M, Kubiay A et al (1993) Bazı Alabalık İşletmelerinde Görülen Pankreatik Nekrozis Hastalığı Üzerine Histopatolojik ve Elektron Mikroskopik Çalışmalar. *Doğu Anadolu Bölgesi I. Su Ürünleri Sempozyumu*. Erzurum.

Tonheim TC, Bogwald J, Dalmo RA (2008) What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol*, 25(July 1-2): 1-18.

Toplu N, Albayrak H, Aydoğan A et al (2010) Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) enfeksiyöz pankreatik nekrozun patogenezisinde apoptozisin rolü. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 57, 191-196.

Trobridge GD, Chiou PP, Kim CH et al (1997) Induction of the Mx protein of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in vitro and in vivo with poly I:C dsRNA and infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis Aquat Org*, 30, 91-98.

- Trobridge GD, Chiou PP, Leong JC (1997) Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein in salmon cells. *J Virol*, 71, 5304-5311.
- Troyer RM, Kurath G (2003) Molecular epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus reveals complex virus traffic and evolution within southern Idaho aquaculture. *Dis. Aquat. Org.*, 55, 175–185.
- Türkiye İstatistik Kurumu 2016 verileri <http://www.tuik.gov.tr/>
- Vasconcelos AC, Lam KM (1994) Apoptosis induced by infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.*, 75, pp. 1803-1806
- Vázquez CL, Dopazo CP, Olveira JG et al (2006) Development of a rapid, sensitive and non-lethal diagnostic assay for the detection of viral hemorrhagic septicemia virus. *Journal of Virological Methods* (133), 167–174.
- Vázquez CL, Dopazo CP, Olveira JG et al (2007) Experimental infection of turbot, *Psetta maxima* (L.), with strains of viral hemorrhagic septicemia virus isolated from wild and farmed marine fish. *Journal of Fish Diseases* (30), 303–312.
- Vestergard Jorgensen PE (1982) Egtved virus: temperature-dependent immune response of trout to infection with low-virulence virus. *Journal of Fish Diseases*, 5, 47-55.
- Vestergard Jorgensen PE, Grauballe PC (1971) Problems in serological typing of IPN virus. *Acta Vet. Scand.* 12: 145-147.
- Walker PJ, Benmansour A, Dietzgen R et al (2000) Family Rhabdoviridae. In: *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses* (ed. by Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB,). Academic Press, San Diego, CA., 563-83.
- Weber S, Fichtner D, Mettenleiter TC (2001) Expression of VP5 of infectious pancreatic necrosis virus strain VR299 is initiated at the second in-frame start codon. *J. Gen. Virol.*, 82, 805–812.
- Wedemeyer GA, Nelson NC, Smith CA (1978) Survival of the salmonid viruses infectious hematopoietic necrosis (IHNV) and infectious pancreatic necrosis (IPNV) in ozonated, chlorinated and untreated waters. *J. Fish Res. Bd. Can.* 35: 875-879.
- Wedemeyer GA, Nelson NC, Yasutake WT (1979) Potentials and limits for the use of ozone as a fish disease control agent. *Ozone Sci. Eng.* 1:295-318.
- Williams IV, Amend DF (1976) A natural epizootic of infectious hematopoietic necrosis in fry of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) at Chilko Lake, British Columbia. *J. Fish. Res. Board Can.* 33: 1564-1567.
- Willimas K, Blake S, Sweeney A, Singer JT, et al. (1999). Multiplex Reverse Transcriptase PCR Assay for Simultaneous Detection of Three Fish Viruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37, 12, 4139–4141.
- Winton JR (1991) Recent advances in the detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in aquaculture. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 1, 83–93.
- Winton JR (1997) Immunization with viral antigens: Infectious haematopoietic necrosis. *Dev. Biol. Stand.*, 90, 211–220.
- Winton JR, Arakawa CK, Lannan CN et al (1988) Neutralizing monoclonal antibodies recognize antigenic variants among isolates of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, 4, 199–204.

Winton JR, Einer-Jensen K (2002) Molecular diagnosis of infectious hematopoietic necrosis and viral hemorrhagic septicemia. In: *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases*, Cunningham C.O., ed. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 49–79.

Wolf K, Dunbar CE, Snieszko SF (1958) Infectious pancreatic necrosis of trout. I. A tissue-culture study. *Prog. Fish-cult.* 22, 63-68.

Wolf K (1970) Guidelines for Virological Examination of Fishes. In *A symposium on diseases of Fishes and Shellfishes*. 327-350.

Wolf K (1988) *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Cornell University Press; Ithaca, NY, USA: 1988.

Wolf K, Qimby MC (1970) Salmonid viruses infectious pancreatic necrosis virus morphology, pathology and serology of first European isolations. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 34, 144-156.

Wolf K, Qimby MC (1973) Fish Viruses Buffers and Methods for Plaquing Eight Agents Under Normal Atmosphere, *Applied Microbiology*, 25, 659–664.

Wolf K, Qimby MC, Carlson CP (1969) Infectious pancreatic necrosis virus lyophilization and subsequent stability in storage at 4°C, *Appl. Microbiol.*, 17623624.

Wolf K, Qimby MC, Carlson CP et al (1968) Infectious pancreatic necrosis: selection of virus-free stock from a population of carrier trout. *J. Fish. Res. Board Can.*, 25(2):383-391.

Wolf K, Qimby MC, Pettijohn LL et al (1973) Fish viruses: isolation and identification of infectious hematopoietic necrosis in eastern North America. *J. Fish. Res. Board Can.* 30: 1625-1627.

Wolf K, Snieszko SF, Dunbar CE et al (1960) Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*; May 104:105–8.

Wood EM, Snieszko SF, Yasutake WT (1955) Infectious pancreatic necrosis in brook trout. *AMA Arch Pathol.*, Jul;60(1):26–28.

Yasutake WT (1970) Comparative Histopathology of Epizootic Salmonid Virus Diseases. *A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes*, American Fisheries Society, 5, 341–350.

Yasutake WT (1975) *Fish Viral Diseases Clinical, Histopathological, and Comparative Aspects*, *The Pathology of Fishes*, Edit by William E Ribelin, George Migaki. The University of Wisconsin Press, London, 247-269.

Zhang YG, Burke CW, Rayman KD et al (2007) Identification and characterization of interferon-induced proteins that inhibit alphavirus replication. *J. Virol.* 81, 11246–11255.

7 SİMGELER VE KISALTMALAR

%: Yüzde
~: Yaklaşık
<: Küçüktür
>: Büyüktür
°C: Celcius derece
µl: Mikro litre
µm: Mikro molar
Ab: Abild
AB: Avrupa Birliği
ABD: Amerika Birleşik Devletleri
Ag- ELISA: Antijen-ELISA
AS: Atlantik Somon hücre hattı
ATCC: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
BF-2: Bluegill Fry hücre hattı
bp: Baz çifti (Base pair)
cDNA: Tamamlayıcı DNA (Complementary DNA)
CFSPH: Gıda Güvenliği ve Halk Sağlığı Merkezi (Center for Food Security and Public Health)
CHSE-214: Chinhook Salmon Embryo-214 hücre hattı
cm²: Santimetre kare
CPE: Sitopatik etki
Ct: Döngü eşiği (Cycle threshold)
DEAE: Dietil aminoetil
DEPC: Dietil pirokarbonat
dH₂O: Distile su
DNA: Deoksiribonükleik asit
dNTP: Deoksinükleotit trifosfat
dsRNA: Çift iplikçikli RNA (Double stranded RNA)
DTT: Dithiothreitol
DXV: Drosophila X virus
EF: Uzama faktörü (Elongation factor)
ELISA: Enzim ilintili immün test (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium
EPC: Epithelioma Papulosum Cyprini
FAT: Floresan antikor testi (*Fluorescent Antibody Test*)
FCS: Fötal dana serumu (Fetal Calf Serum)
FHM: Fathead Minnow hücre hattı
FRS: Balıkçılık Araştırma Servisi (Fisheries Research Services)
g: Gram
GTHB: Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı
HCl: Hidro klorür

He: Hetch
HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic asit,
Hz: Hertz
IBDV: İnfeksiyöz Bursal Hastalığı Virüsü
ICTV: Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses)
IFAT: Dolaylı floresan antikor testi (Indirect Fluorescent Antibody Test)
IFN: İnterferon
Ig: İmmunglobulin
IHN: İnfeksiyöz Hematopietik Nekroz
IHNV: İnfeksiyöz Hematopietik Nekroz Virüsü
IPN: İnfeksiyöz Pankreatik Nekroz
IPNV: İnfeksiyöz Pankreatik Nekroz Virüsü
IU: Uluslararası birim (International Unit)
kb: Kilo baz (Kilo base)
kbp: Kilo baz çifti (Kilo base pair)
KCl: Potasyum klorür
kDA: Kilo dalton
L: Litre
LB: Luria Bertani
M: Molar
mg: Miligram
MgCl₂: Magnezyum klorür
mM: Milimolar
mRNA: Haberci RNA (Messenger RNA)
nm: Nanometre
NS: Yapısal olmayan (Non Structural)
NV: Virion olmayan (Non Virion)
OIE: Uluslararası Hayvan Sağlığı Örgütü (World Organisation for Animal Health)
ORF: Açık okuma çerçevesi (Open Reading Frame)
PBS: Fosfatlanmış tuzlu su (Phosphate Buffer Solution)
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PEG: Polietilen glikol
pH: Hidrojen potansiyeli (Potential of Hydrogen)
ppm: Milyonda bir (parts-per-million)
pVP: Öncül VP (Precursor VP)
PVP: Polyvinylpyrrolidone
RdRp: RNA bağımlı RNA polimeraz (RNA-dependent RNA polymerase)
RNA: Ribonükleik asit
rpm: Dakikadaki dönme sayısı (Revolutions per minute)
RTG-2: Rainbow Trout Gonad-2 hücre hattı
RT-PCR: Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Reverse transcription polymerase chain reaction)
RT-qPCR: Eş Zamanlı Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Reverse transcription polymerase chain reaction)
SN₅₀: Serum nötralizasyon₅₀
Sp: Spajarup
SÜMAE: Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü

TAE: Tris Acetate-EDTA

TCID₅₀: Doku kültürünün yarısını enfekte eden doz (Median Tissue Culture Infective Dose)

TO: Atlantik somon ön böbrek hücre hattı

U/ μ l: Birim/Mikrolitre (Mikrolitresindeki birim)

UV: Ultra Viyole

v/v: Hacim/ hanım (volume/ volume)

V: Volt

VHS: Viral Hemorajik Septisemi

VHSV: Viral Hemorajik Septisemi Virüsü

Vip: Viperin (Virus inhibitory protein endoplasmatic reticulum associated interferon inducible)

VP: Viral Protein

w/v: Ağırlık/ hacim (weight/volume)

WB: West Buxton

X-gal: 5-(Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside)

8 TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde, araştırma aşamasında, yön tayininde ve tamamlanmasında destek olan değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Soner ALTUN'a bana ayırdığı değerli zamanı ve sağladığı desteği için minnettarım Tezimin başlangıcından bitimine kadar bana inanan, yardımlarını esirgemeyen, bildiklerini paylaşan Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Viroloji Bölümü çalışanlarına ve saha çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen tüm çiftlik personeli arkadaşlarıma (Çalışma yapılan çiftliklerin gizliliği ilkesine binaen isimleri yazılmamıştır) en içten teşekkürleri sunuyorum. Tezimin laboratuvar çalışmaları kısmını Norveç Veteriner Fakülte'sinde gerçekleştirmem için finansal destek sağlayan Yüksek Öğretim Kurumu'na (YÖK) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) çok teşekkür ederim. Tezimin tamamlanmasında çok büyük paya sahip olan Prof. Dr. Espen RIMSTAD ve ekibine teşekkürlerimi kendi dillerinde sunmak istiyorum.

Den største bidragsyteren til denne avhandlingen er min akademiske helt, den ærverdige Prof. Dr. Espen Rimstad, som lærte meg nærmest alt jeg vet. Jeg ønsker å takke ham for veldig god veiledning. Jeg vil også takke alle på laboratoriet for all støtte og velvillig deling av kunnskap. Spesielt vil jeg takke de fire nydelige menneskene Elisabeth Furuseth Hansen, Stine Braaen, Ingvild Berg Nyman og Turhan Markussen. Videre vil jeg takke "biricik Ceren'ime ve Özlem'ime" og alle i bygg 18 på campus for fin støtte i de mørke, kalde og ensomme Oslo dagene. Dere varmet mitt hjerte med deres smilende ansikter. Etter å ha vært der for meg under en av de vanskeligste periodene i mitt liv, vil dere alltid ha en plass i mitt hjerte.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu zorlu doktora maceramda da beni yalnız bırakmayan, ne zaman pes etsem var gücüyle beni motive eden, laboratuvarda sabahladığım günlerde üşenmeden bana yemek getiren, varlığıyla bana güç veren kahramanım, her şeyim, biricik anneme teşekkürlerin en büyüğünü gönderiyorum. Her şeye rağmen gelecek güzel günlere inanıyorsam, dünyanın hala yaşanabilir bir yer olduğunu düşünüyorsam senin sayende canım annem. Sen olmasan başaramazdım, her zaman söylediğim gibi "Senin için zaferlerim!".

9 ÖZGEÇMİŞ

Haziran 1986 yılında Mersin’de doğmuştur. 2005 yılında Mersin Ticaret ve Sanayi Odası Anadolu Lisesi’ni bitirmiştir. Aynı yıl Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi’ni kazanmış, bir yıllık İngilizce hazırlık eğitimini başarıyla tamamladıktan sonra 2006 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi’ndeki eğitimine başlamıştır. 2008 yılında U.S. State Department tarafından verilen burs ile Nazareth College’da (New York, Amerika) 5 haftalık eğitim almıştır. 2008-2009 akademik yılını Erasmus Öğrenci Değişim Programı bursu ile Szent Istvan Üniversitesi’nde (Budapeşte, Macaristan) başarıyla tamamlamıştır. 2010 yılında zorunlu yaz stajını IAESTE (The International Association for the Exchange of Students for Technical Experience) bursu ile Justus Liebig Üniversitesi’nde (Giessen, Almanya) yapmıştır. 2011 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden dönem birincisi olarak mezun olmuştur. Aynı yıl eylül ayında Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başlamıştır. Şubat 2013 tarihinde Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Su Ürünleri Hastalıkları ABD’na araştırma görevlisi olarak atanmıştır. Yüksek Öğretim Kurumu (YÖK) tarafından verilen “Doktora Sırası Araştırma Bursu” ile Ağustos- Kasım 2013 tarihleri arasında 3 ay süreyle doktora tez konusu ile ilgili çalışmalar yapmak üzere Norveç Veteriner Fakültesi’nde (Oslo, Norveç) bulunmuştur. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından verilen “Doktora Sırası Araştırma Projesi Bursu” ile yine Norveç Veteriner Fakültesi’nde (Oslo, Norveç) bir yıl doktora tezi çalışmalarını yapmıştır. Doktora eğitimi süresince bir tanesi ilk isim olmak üzere 9 adet uluslararası indekslerde taranan özgün makalelerde yer almıştır. Gerek yurtdışında gerekse yurtiçinde yapılan bilimsel toplantılarda sözlü ve yazılı sunumlar gerçekleştirmiştir. Ağustos 2017 tarihinde doktora tez çalışmasını tamamlamıştır.