



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**TÜRKİYE’DE LEVREK KULUÇKAHANELERİ VE
İŞLETMELERİNDE VİRAL NERVÖZ NEKROZİS (VNN)
VİRUSU’NUN ARAŞTIRILMASI, EPİDEMİYOLOJİSİ
VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Murat KAPLAN

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet Taner KARAOĞLU**

**ANKARA
2019**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE’DE LEVREK KULUÇKAHANELERİ VE
İŞLETMELERİNDE VİRAL NERVÖZ NEKROZİS (VNN)
VİRUSU’NUN ARAŞTIRILMASI, EPİDEMİYOLOJİSİ
VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Murat KAPLAN

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet Taner KARAOĞLU**

**ANKARA
2019**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Türkiye’de Levrek Kuluçkahaneleri ve İşletmelerinde Viral Nervöz Nekrozis (VNN) Virusu’nun Araştırılması, Epidemiyolojisi ve Moleküler Karakterizasyonu” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Murat KAPLAN

Tarih: 31.12.2019

İmza:



Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Viroloji Anabilim Dalında

Murat KAPLAN tarafından hazırlanan “Türkiye’de Levrek Kuluçkahaneleri Ve İşletmelerinde Viral Nervöz Nekrozis (VNN) Virusu’nun Araştırılması, Epidemiyolojisi Ve Moleküler Karakterizasyonu” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul / red edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20.12.2019

Prof.Dr. Yılmaz AKÇA

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı



Prof.Dr. M. Taner KARAOĞLU (Danışman)

Ankara Üniversitesi

Üye



Prof.Dr. Yakup YILDIRIM

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Üye

Prof.Dr. Hakan YARDIMCI

Ankara Üniversitesi

Üye

Prof.Dr. V. Soydal ATASEVEN

Mustafa Kemal Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof.Dr. Mehmet AKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xvi
Çizelgeler	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1.Tarihçe	4
1.2.Etiyoloji	5
1.2.1.Sınıflandırma	5
1.2.2.Virusun Yapısı ve Özellikleri	9
1.2.2.1. Morfolojik Yapı	9
1.2.2.2. Genetik Yapı	10
1.2.2.2.1. RNA1	12
1.2.2.2.2. RNA2	12
1.2.2.2.3. RNA3	15
1.2.3. Virus Replikasyonu	16
1.2.4. Genetik ve Serolojik Farklılıklar	18
1.2.5. Reassortment	21
1.2.6. Etken Stabilitesi	24
1.2.6.1. Çevresel Dayanıklılık	24
1.2.6.2. Kimyasal Dayanıklılık	25
1.3.Epidemiyoloji	25
1.3.1.Bulaşma	25
1.3.1.1.Horizontal Bulaşma	25
1.3.1.2. Vertikal Bulaşma	27
1.3.2. Konakçı Dağılımı	28
1.3.3. Konakçı Duyarlılık Dönemleri	30
1.3.4. Hastalığın Coğrafi Dağılımı	31
1.3.4.1. Hastalığın Dünyadaki Durumu	31
1.3.4.2. Hastalığın Türkiye'deki Durumu	33
1.3.5. Prevalans	34
1.4. Patogenez	35
1.4.1. İmmun Yanıttan Kaçınma Mekanizması	37
1.4.2. Konakçı İmmun Yanıt Mekanizması	39
1.5. Klinik Belirtiler	41
1.6.Teşhis	43
1.6.1. Örneklem Stratejisi	43
1.6.2. Teşhis Metotları	44
1.6.2.1. Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu	44
1.6.2.2. İmmunofloresan	45
1.6.2.3. Histopatoloji	45

1.6.2.4. Elektron Mikroskopi	46
1.6.2.5. Moleküler Teknikler	47
1.6.2.6. Serolojik Testler	48
1.6.3. Tanı Metodunun Seçimi	48
1.6.4. Destekleyici Tanı Kriterleri	50
1.6.4.1. Şüpheli Vakaların Tanımlanması	50
1.6.4.2. Konfirme Vakanın Tanımlanması	50
1.7. Korunma ve Kontrol	50
1.7.1. Biyogüvenlik Önlemleri	51
1.7.2. Aşılama	52
1.7.2.1. Aşı Çalışmaları	53
1.7.2.1.1. İnaktif Aşılar	53
1.7.2.1.2. Rekombinant Aşılar	53
1.7.2.1.3. Virus Benzeri Parçacıklar	54
1.7.2.1.4. Sentetik Peptit Aşıları	54
1.7.2.1.5. DNA Aşıları	55
1.7.2.2. Aşılama Yöntemleri	55
1.8. Tedavi	57
2. GEREÇ ve YÖNTEM	61
2.1. Gereç	61
2.1.1. Örnekleme ve Kayıt	61
2.1.1.1. Kuluçkahane Örneklemesi	61
2.1.1.2. Yetiştirme İşletmesi Örneklemesi	65
2.1.1.3. Retrospektif Epidemiyolojik Çalışma	67
2.1.2. Hücre kültürü	67
2.1.3. RNA Ekstraksiyonu	67
2.1.4. Kantitatif Real Time RT-PCR	67
2.1.5. cDNA Sentezi, PCR ve Dizi Analizi	68
2.1.6. Pozitif Kontrol ve Plazmid	70
2.2. Yöntem	70
2.2.1. Örneklerin Hazırlanması	70
2.2.2. Pozitif Kontrol ve Plazmid Klonlama	71
2.2.3. RNA Ekstraksiyonu	72
2.2.4. Kantitatif Real Time RT-PCR Optimizasyonu	72
2.2.4.1. Mastermiks Bileşimi ve PCR Koşulları	73
2.2.4.2. Analitik Sensitivite ve Minimum Tespit Limiti	74
2.2.4.3. Spesifite	74
2.2.4.4. Tekrarlanabilirlik ve Tekrar Üretilirlik	75
2.2.5. Pozitif Örneklerde Viral Yük Tespiti	75
2.2.6. Moleküler Çalışmalar	75
2.2.6.1. cDNA Sentezi	75
2.2.6.2. Kısmi Genom Dizileme ve Filogenetik Çalışmalar	76
2.2.6.3. Tüm Genom Dizileme ve Filogenetik Çalışmalar	78
2.2.7. Virus İzolasyonu	79

3. BULGULAR	80
3.1. Kantitatif Real Time RT-PCR Optimizasyonu	80
3.1.1. Analitik Sensitivite ve Minimum Tespit Limiti	80
3.1.2. Spesifite	83
3.1.3. Tekrarlanabilirlik ve Tekrar Üretilebilirlik	84
3.2. Epidemiyolojik Veriler	86
3.2.1. Levrek Kuluçkahanelerinde VNN Virusunun Varlığının Araştırılması	86
3.2.2. Levrek Yetiştirme İşletmelerinde VNN Virusunun Varlığının Araştırılması	93
3.2.3. Retrospektif Epidemiyolojik Çalışma	97
3.3. Pozitif Örneklerin Viral Yüklerinin Belirlenmesi	98
3.4. Pozitif Örneklerin Kısmi Genom Dizileme ve Filogenetik Analizleri	99
3.5. Pozitif Örneklerin Tüm Genom Dizileme ve Filogenetik Analizleri	105
3.5.1. RNA1 Tüm Genom Analizi	105
3.5.2. RNA2 Tüm Genom Analizi	114
3.6. Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu	124
4. TARTIŞMA	126
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	147
ÖZET	151
SUMMARY	152
KAYNAKLAR	154
EKLER	171
Ek-1. Etik Kurul İzin Yazısı	171
Ek-2. Doktora Tez Konusunun Çalışılması Hakkında Bakanlık İzin Yazısı	172
Ek-3. Tez Pozitif Örneklerinin Nükleotid Dizileri	173
Ek-4. Tez Çalışmasının RNA1 ve RNA2 Kısmi Nükleotid Dizilerine Göre Yapılan Filogenetik Çalışmalarında Kullanılan İzolatların Genbank Bilgileri	178
Ek-5. Tez Çalışmasının RNA1 ve RNA2 Tüm Genom Nükleotid Dizilerine Göre Yapılan Filogenetik Çalışmalarında Kullanılan İzolatların Genbank Bilgileri	180
Ek-6. Tez Çalışmasında Akdeniz İzolatlarının Kapsid Protein (RNA2 ORF) Tüm Genom Nükleotid Dizilerine Göre Yapılan Filogenetik Çalışmalarda Kullanılan İzolatların Genbank Bilgileri	182
ÖZGEÇMİŞ	183

ÖNSÖZ

Viral Nervöz Nekrozis (VNN) etkeni betanodaviruslar, dünya üzerinde 120'den fazla balık türünden izole edilmiş olup son otuz yılda Güney Amerika hariç pek çok bölgede farklı dört genotipinin izolasyonları yapılmıştır. VNN, pek çok balık türünü etkilemesine rağmen, farklı genotiplerin farklı sıcaklıklara adaptasyonu; farklı coğrafyalardaki farklı balık türlerinin etkilenmesi ile sonuçlanmıştır. VNN, Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz havzasında endemik bir özellik kazanmış ve Akdeniz'de kıyı olan hemen her ülkede betanodavirus salgınları Redspotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV) genotipi ile ilişkili olarak levreklerde ölümler meydana getirmiştir. VNN, levrek kültür balıkçılığını etkileyen en önemli hastalık olarak kayıtlara geçmiştir. Vertikal ve horizontal yolla bulaşabilen betanodaviruslar, merkezi sinir sistemi ve retina'da vakuolizasyonlarla ilişkili olarak özellikle fingerling boy balıkların içinde olduğu yavrularda ölümlere veya persiste enfeksiyonlara neden olmaktadır. Hastalığın bir kuluçkahane veya yetiştirme işletmesine bulaşması, anaçların değiştirilmesine kadar değişen pek çok kontrol önlemi almayı gerektirmekle beraber virusun eradikasyonunun oldukça çok zor olduğu bildirilmektedir.

Türkiye'de ilk betanodavirus izolasyonu 2011 yılında yapılmış olmasına rağmen, yüksek mortaliteli salgınlara ilişkin bildirim bulunmamaktadır. Türkiye, sahip olduğu zengin su kaynakları, üç tarafının denizlerle çevrili olması, iklimin uygun olması ve kültür balıkçılığındaki önemli gelişmeler sayesinde levrek üretiminde % 42'lik bir pay ile dünya ve Avrupa'da söz sahibi ülke konumundadır. Yüksek üretimin sürdürülebilirliğinin bir bileşeni de üretimin düşmesine ve ekonomik kayıplara neden olan salgın hastalıklarla mücadele etmektir. Bunun yanında kontrol ve izleme çalışmalarının yapılması ile erken uyarı sistemlerinin oluşturulması, salgınlara hazırlık veya daha kolay mücadele etmede önemli politikalardır. Türkiye'de ve uluslararası hastalık bildirim sistemlerinde ihbari mecburi bir hastalık olmamasına rağmen, önemli ekonomik kayıplara neden olan ve uluslararası ticarete önemli yer tutan VNN ile ilgili tarama, izleme ve arılık

alışmalarının yapılması, levrek üretiminde önemli bir seviyede bulunan Türkiye’de, kültür levrek yetiştiriciliğinin sürdürülebilirliğı açısından önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında Türkiye’de faaliyette bulunan tüm levrek kuluçkahaneleri ve bazı yetiştirme işletmelerinde betanodavirus yaygınlığının ve enfeksiyon kaynaklarının belirlenmesi ve virusun eliminasyonu ile ilgili mücadele stratejilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Doktora eğıtirim ve tez çalışmalarım süresince yakın ilgi, yardım ve tavsiyelerini esirgemeyen, gerek bilimsel gerek sosyal anlamda bana her zaman destek ve güven veren doktora danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet Taner KARAOĞLU’na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğıtirim ve tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Yılmaz AKÇA’ya, Sayın Prof. Dr. Feray ALKAN’a, Sayın Prof. Dr. Aykut ÖZKUL’a, Sayın Prof. Dr. Seval Bilge DAĞALP’e ve Sayın Prof. Dr. Tuba iğdem OĞUZOĞLU’na ve tez izleme komitesindeki olumlu katkılarından dolayı Ankara Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Hakan YARDIMCI’ya ve doktora eğıtirim süresince yardımlarını esirgemeyen tüm doktora öğrencisi arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora çalışmamı yürüttüğüm süre zarfında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, bilgilerini paylaşarak her zaman katkı sağılayan İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Viroloji Bölümü’nde çalışan değıerli arkadaşlarım Dr. Kemal PEKMEZ, Dr. A. Anıl ÇAĞIRGAN ve Ramazan TÜRKMEN’e ne kadar teşekkür etsem azdır. Doktora ve tez çalışmam süresince katkılarını esirgemeyen Enstitü Teknik İşler Sorumlusu Dr. Gülnur KALAYCI ve Veteriner Hekim Dr. Buket ÖZKAN’a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmasının örnekleme aşamasında olumlu katkıları ve planlamaların oluşturulmasında emeğı geçen Veteriner Hekim Ali Emre CANITEZ’e ayrıca teşekkür ederim. Betanodaviruslar ile ilgili bazı görüşlerine başvurduğum ve moleküler çalışmalarda literatür bilgilerini paylaşan VNN OIE Referans Laboratuvarı Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie,

Dipartimento di Ittiopatologia, Italy’de çalışan Valentina Maria PANZARİN’e çok teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca beni destekleyen, beni ben yapan, maneviyatını hiçbir zaman tartışamayacağım canım annem Ayşe KAPLAN’a tüm kalbimle sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım. Ayrıca babam Naci Tursun KAPLAN, ablam Nuray GÜL ve Gülay DEMİRTAŞ’a doktoram süresince gösterdikleri desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tüm doktoram boyunca beni destekleyen, her zaman yanımda olan, hayatımı paylaştığım ve maalesef doktora süresince istemeyerek ihmal ettiğim ve bunu hiçbir zaman sorun etmeden bana daha çok güven veren, biricik eşim Sevcan KAPLAN’a, kızım Elis KAPLAN’a ve oğlum Batu KAPLAN’a ne kadar teşekkür etsem azdır.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	alfa
β	beta
γ	gama
$^{\circ}$	Derece
A	Adenin
aa	amino asit
ABV	Apatojen Aquabirnavirus
ADNS	Animal Diseases Notification System
AHNNV	Atlantic Halibut Nervous Necrosis Virus
AMP	Antimikrobiyal Peptit
Arg	Arjinin
ATP	Adenozin Tri Fosfat
BB	Barramundi Brain Cell Hücre Hattı
bç	Baz Çifti
BEI	Binary Ethylenimine
BFNNV	Barfin Flounder Nervous Necrosis Virus
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Santigrad
C	Sitozin
Ca	Kalsiyum
CD	Cluster of Differentiation
cm	Santimetre
cm ³	Santimetreküp
CsCl	Sezyum klorid
CP	Kapsid Proteini
CPE	Sitopatik etki
cRNA	Komplementer RNA
Ct	Cycle threshold
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
CV	Coefficient of Variation (değişim oranı)

DGNNV	Dragon grouper nervous necrosis virus
DIEV	Dicentrarchus Labrax Encephalitis Virus
DKID	Doku Kùltürü İnfektif Doz
DNA	Deoksiribo Nùkleik asit
dNTP	Deoksi Nukleotid Tri Phosphate
d.p.v.	Aşılamadan Sonraki Günler (Days post-vaccination)
Drp1	Dinamin İlişkili Protein
DY	Döllenmiş Yumurta
E	Efficiency (Verimlilik)
ELISA	Enzim Linked Immunosorbent Assay
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
Epi-1	Epinisin-1
ER	Endoplazmik Retikulum
E-11	SSN-1'den Klonlanan Hücre Hattı
F	Forward
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FBS	Fötal Bovine Serum
FVE	Fish Viral Encephalitis
g	Gram
g	Gravity
G	Gamma Distributed
G	Guanin
GATA3	İmmun T hücrelerinde lokalize Th2 gelişiminden sorumlu transkripsiyonel faktör
GGNNV	Greasy Grouper Nervous Necrosis Virus
GF-1	Goldfish Fin Hücre Hattı
GHSC70	Isı Şoku Kökenli Protein 70
GpppN	N7-Methylguanosine-triphosphate
GSMH	Gayri Safi Milli Hasıla
h.p.i.	Hours Post-Infection (Enfeksiyondan Sonraki Saatler)
H ₂ O	Su
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit

ICTV	Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi
IF	İmmunofloresan
IFAT	İmmunofloresan Antikor Testi
IFN	İnterferon
Ig	İmmun globulin
IHC	İmmunohistokimyasal
IHNV	Infectious Hematopoietic Necrosis Virus
IL	İnterlökin
Ile	izolaysin
İ.m.	İntramuskuler
i.p.	İntraperitoneal
IPN	İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis
ISH	İn Situ Hibridizasyon
JFNNV	Japanese Flounder Nervous Necrosis Virus
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
km	Kilometre
K2	Kimura 2-parameter
LAMP	Loop-Mediated İsothermal Amplification
LcEV	Lates calcarifer encephalitis virus
L-15	Leibovitz's Medium
MAV	Mitokondriyal Antiviral Sinyal
MHC-I	Major Histocompatibility Complex Sınıf I
MHC-II	Major Histocompatibility Complex Sınıf II
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MMP	Mitokondriyal Membran Potansiyeli
MPTP	Mitokondriyal Permeabilite Geçiş Gözeneği
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
<i>Mx</i>	Myxovirus

MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response 88 (Miyeloid Diferansiyasyon Faktör 88)
NASBA	Nucleic Acid Sequence Based Amplification
NCBI	National Central for Biotechnology Information
NJ	Neighbor Joining
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NNV	Nervöz Nekrozis Virus
nt	Nükleotid
OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
ORF	Açık okuma çerçevesi
pH	Power of Hydrogen
Poly I: C	Polycytidylic Acid
PostL	Post larva
PreL	Prelarva
PS	Fosfatidilserin
qPCR	Kantitatif PCR
qrt RT-PCR	Kantitatif rtRT-PCR
pMol	Pikomol
R	Reverse
RdRp	Viral RNA'ya bağlı RNA polimeraz
RGNNV	Redspotted Grouper Nervous Necrosis Virus
RGNNV/SJNNV	RNA1 segmentine göre RGNNV; RNA2 segmentine göre SJNNV reassortant betanodavirus suşu
RIG-1	Retinoic Acid Inducible Gene-I (Retinoik Asit İndükleyen Gen-1)
RLR	RIG-1 like receptors (RIG-1 benzeri reseptör)
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RT	Reverse Transcription
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
rt RT-PCR	Real time RT-PCR
RNA	Ribo Nükleik asit

RPS	Relative <i>Percentage Survival</i> (rölatif hayatta kalma oranı)
RT-PCR	Revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
R^2	Regresyon katsayısı
SJNNV	Striped Jack Nervous Necrosis Virus
SJNNVO	Striped Jack Nervöz Nekrozis Virus
SJNNV/RGNNV	RNA1 segmentine göre SJNNV; RNA2 segmentine göre RGNNV reassortant betanodavirus suşu
siRNA	Susturucu RNA
SSN-1	Striped Snakehead Fish Fry
SVE	Sea bass Viral Encephalitis
T	Timin
T-bet	İmmun T hücrelerinde lokalize Th1 gelişiminden sorumlu transkripsiyonel faktör
Th1	İmmun yanıt sitokin grubu (Interferon gamma)
TH1-5	Tilapia Hecpidin 1-5
Th2	İmmun yanıt sitokin grubu (IL 4, 5, 10 ve 13)
TLR	Toll-like receptors (çan benzeri reseptör)
TMS	Tricaine Methane Sulfonate
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TNV	Turbot Nervöz Nekrozis Virus
TN93	Tamura-Nei
TPNNV	Tiger Puffer Nervous Necrosis Virus
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
TÜRKAK	Türk Akreditasyon Kurumu
U	Ünite
U	Urasil
UTR	Untranslated Region
UV	Ultraviyole
Val	Valin
VER	Viral Ensefalopati ve Retinopati
VHS	Viral Hemorajik Septisemi
VLP	Virus like particle (Virus Benzeri Parçacıklar)

VNN	Viral Nervöz Nekrozis
VNNV	Viral Nervöz Nekrozis Virusu
vRNA	Viral RNA
w.p.i.	Enfeksiyondan Sonraki Haftalar (Weeks Post-Infection)
1/r	Eşik Değeri
%	Yüzde
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. FAO 2018 Yılı İstatistiklerine Göre Dünyada Levrek Üreten Ülkelerin Yıllık Üretim Miktarları	3
Şekil 1.2. FAO 2018 Yılı İstatistiklerine Göre Türkiye'nin Dünya Levrek Üretimindeki Payı	3
Şekil 1.3. 2016 Yılı Verilerine Göre En Önemli Tuzlu Su (Deniz) Hastalıkları	4
Şekil 1.4. Nodaviridae ailesinin RNA1(a) ve RNA2(b) tüm genom aminoasit analizine göre filogenetik yakınlıkları	8
Şekil 1.5. Nodavirus Virion Yapısı	9
Şekil 1.6. Betanodavirus Cryoelektronmikroskopik Görüntüsü	9
Şekil 1.7. Nodavirus Genom Yapısı	10
Şekil 1.8. Betanodavirus Genom Yapısı	11
Şekil 1.9. GNNV-LP kapsid proteini C alt ünitesi şematize gösterimi	14
Şekil 1.10. RGNNV'nin Nekrotik Hücre Ölümünü İndüklemesi	38
Şekil 2.1. Levrek örneklerinin gruplandırılması	70
Şekil 2.2. Beyin ve omuriliğin homojenizasyon için çıkarılması	71
Şekil 3.1. Plazmid DNA'nın farklı sulandırmalarının Ct değerleri ve kopya miktarları	81
Şekil 3.2. Plazmid DNA'nın farklı sulandırmalarının amplifikasyon eğrileri	82
Şekil 3.3. Standart Eğri	82
Şekil 3.4. VNNV için optimize edilen qrtRT-PCR Test Metodu'nun Diğer Balık Viruslarında Kullanımı ve Ayrımı	83
Şekil 3.5. Yavru levrek örneklerinin yaş gruplarına göre iller bazında dağılımı	90
Şekil 3.6. Yavru levrek örneklerinin yaş gruplarına göre yüzdelik dağılımları	91
Şekil 3.7. Yavru levrek örneklerinin yaş gruplarına göre aylar bazında örnekleme sayıları	92
Şekil 3.8. Pozitif örneklerin direkt doku homojenizatlarından yapılan qrtRT-PCR testi sonuçları	97
Şekil 3.9. Pozitif örneklerin hücre kültüründe izolasyonundan sonra yapılan qrtRT-PCR testi sonuçları	98
Şekil 3.10. RNA1 segmentinin kısmi dizilerine göre filogenetik ağaç	102

Şekil 3.11. RNA2 segmentinin kısmi dizilerine göre filogenetik ağaç	103
Şekil 3.12. Hizalanmış RNA1 segmentinin 5' UTR ve ORF başlangıç bölgesi	105
Şekil 3.13. Hizalanmış RNA1 segmentinin 3' UTR ve ORF bitiş bölgesi	105
Şekil 3.14. RNA1 segmentinin ORF protein A nükleotid dizilerine göre filogenetik ağaç	106
Şekil 3.15. RNA1 tüm genom dizilerine göre nükleotid farklılıkları ve pozisyonları	109
Şekil 3.16. Protein A (RNA1 ORF) tüm genom dizilerine göre aa farklılıkları ve pozisyonları	112
Şekil 3.17. Hizalanmış RNA2 segmentinin 5' UTR ve ORF başlangıç bölgesi	113
Şekil 3.18. Hizalanmış RNA2 segmentinin 3' UTR (başlangıç kısmı) ve ORF bitiş bölgesi	114
Şekil 3.19. RNA2 segmentinin kapsid proteini tüm nükleotid dizilerine göre filogenetik ağaç	115
Şekil 3.20. Kapsid Protein (RNA2 ORF) tüm genom dizilerine göre nükleotid farklılıkları ve pozisyonları	121
Şekil 3.21. Kapsid Proteini (RNA2 ORF) tüm genom dizilerine göre aa farklılıkları ve pozisyonları	123
Şekil 3.22. qrtRT-PCR ile VNN virusu pozitif bulunan örneklerin SSN-1 hücre hattında CPE görüntüsü	124

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Türkiye’de yetiştiriciliği en çok yapılan balık türlerinin üretim miktarları	2
Çizelge 1.2. Nodavirusların Genel Sınıflandırılması	7
Çizelge 1.3. Betanodavirusun genotipik ve fenotipik sınıflandırılması	20
Çizelge 1.4. Betanodavirus surveylans, tespit ve tanı metotları	49
Çizelge 2.1. Aktif levrek kuluçkahaneler ve örnekleme tarihleri	63
Çizelge 2.2. Örnekleme kesinleşen kuluçkahaneler ve üretim dönemleri	64
Çizelge 2.3. Örneklenecek levrek yetiştirme işletmeleri ve örnekleme tarihleri	66
Çizelge 2.4. Real Time RT-PCR testinde kullanılan primer ve prob dizilimleri	68
Çizelge 2.5. Kısmi dizilemede kullanılan primerler ve ürün büyüklükleri	69
Çizelge 2.6. Tüm genom dizilemede kullanılan primerler ve ürün büyüklükleri	69
Çizelge 2.7. qrtRT-PCR Mastermiks hazırlamada kullanılan reagentların oranları	73
Çizelge 2.8. qrtRT-PCR reaksiyon ısı koşulları ve döngü sayıları	74
Çizelge 2.9. cDNA sentezinde kullanılan mastermiks bileşimi ve reaksiyon koşulları	76
Çizelge 2.10. Kısmi ve tüm genom dizileme için yapılan PCR’da mastermiks bileşimi	77
Çizelge 2.11. Kısmi ve tüm genom dizileme için yapılan PCR’da reaksiyon ısı koşulları ve döngü sayıları.	77
Çizelge 3.1. Plazmid DNA’nın farklı dilüsyonlarının üç tekrarlı Ct sonuçlarına göre regresyon değerleri	83
Çizelge 3.2. qrtRT-PCR validasyon parametreleri ve sonuçları	84
Çizelge 3.3. qrtRT-PCR testinin tekrarlanabilirlik verileri	84
Çizelge 3.4. qrtRT-PCR testinin tekrar üretilebilirlik sonuçları	85
Çizelge 3.5. Örneklenen kuluçkahaneler, örnek türleri, sayıları, örnekleme tarihleri ve test sonuçları	86
Çizelge 3.6. Yavru levrek örneklerinin yaş gruplarına göre iller bazında dağılımı	91
Çizelge 3.7. Yavru levrek örneklerinin yaş gruplarına göre aylar bazında örnekleme sayıları	91

Çizelge 3.8. Örneklenen levrek yetiştirme işletmeleri, örnek sayıları, örneklem tarihleri ve test sonuçları	93
Çizelge 3.9. RNA1 segmentinin kısmi dizilerine göre nükleotid benzerlik oranları	101
Çizelge 3.10. RNA2 segmentinin kısmi dizilerine göre nükleotid benzerlik oranları	101
Çizelge 3.11. Protein A (RNA1 ORF) tüm genom dizilerine göre nükleotid benzerlik oranları	107
Çizelge 3.12. Kapsid Protein (RNA2 ORF) tüm genom dizilerine göre nükleotid benzerlik oranları	118
Çizelge 3.13. Kapsid Protein (RNA2 ORF) tüm genom dizilerine göre Akdeniz İzolatlarının nükleotid benzerlik oranları	119

1. GİRİŞ

Viral Nervöz Nekrozis (VNN) veya Viral Ensefalopati ve Retinopati (VER), pek çok deniz balığı türünde merkezi sinir sistemi ve retinada vakuolizasyonlarla ilişkili olarak önemli kayıplara neden olan ciddi bir viral hastalıktır (Anonim, 2017a). Ekonomik önemi yüksek pek çok balık türünün VNN virusuna duyarlı olduğu kanıtlanmıştır (Toffan ve ark., 2017).

VNN hastalığı, son otuz yıldır deniz balıkçılığı yetiştiriciliğinin ciddi bir problemi haline gelmiştir. Hastalık, yakın geçmişte kültürü yapılan tatlı su balıklarıyla da ilişkilendirilmiştir (Costa ve Thompson, 2016).

Ülkemiz gerek deniz gerekse iç su kültür balığı yetiştiriciliği açısından oldukça önemli kaynaklara sahiptir. Ülkemizde su ürünleri yetiştirme teknolojisinin gelişimi ile beraber levrek kültürü üzerindeki çalışmalar 1980’den sonra artmış ve günümüzde başarılı sonuçlara ulaşılmıştır (Alpbaz, 2005).

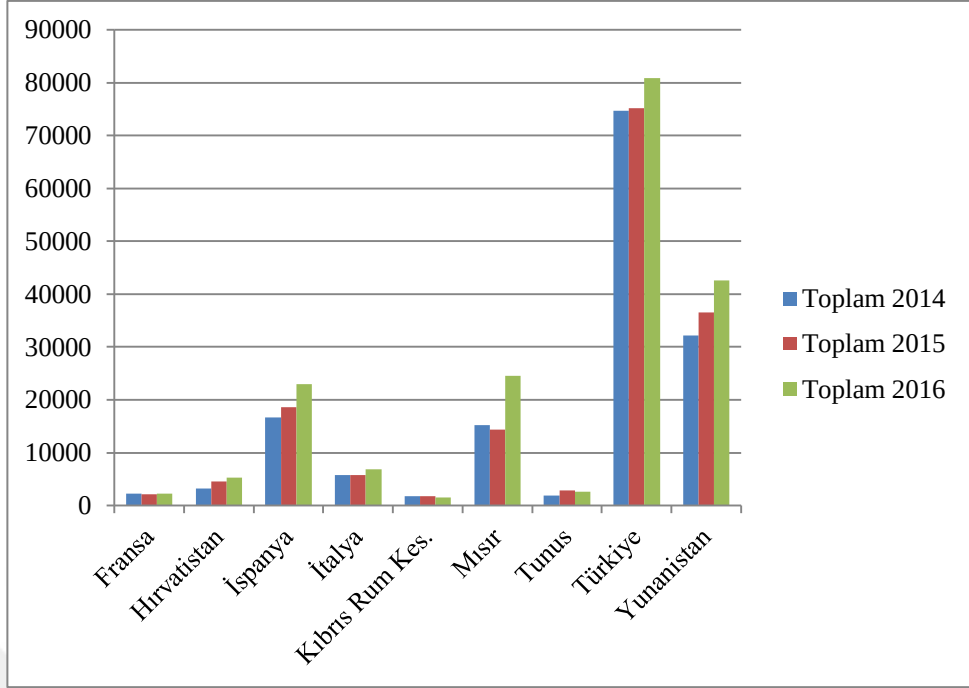
Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2016 yılı verilerine göre ülkemizde kültürü yapılan toplam balık miktarı 246.114 tondur. Bunun 80.847 tonu levrek olmakla birlikte, levrek üretiminin toplam kültür balıkçılığındaki payı % 32,8’dir (Çizelge 1.1). Ülkemiz hayvancılık sektöründe özellikle Avrupa Birliği ülkelerine yapılan ihracatta levrek oldukça önemlidir. Ülkemizde deniz kültür balıkçılığındaki toplam tesis sayısı ise 427 adettir (Anonim, 2018a).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)’nın son olarak 2018 yılı Mart ayında güncellediği istatistiklere göre, dünyadaki toplam levrek üretimi yıllara oranla artmış ve 2016 yılı itibarıyla tüm dünyada 191.003 tona ulaşmıştır (Anonim, 2018b).

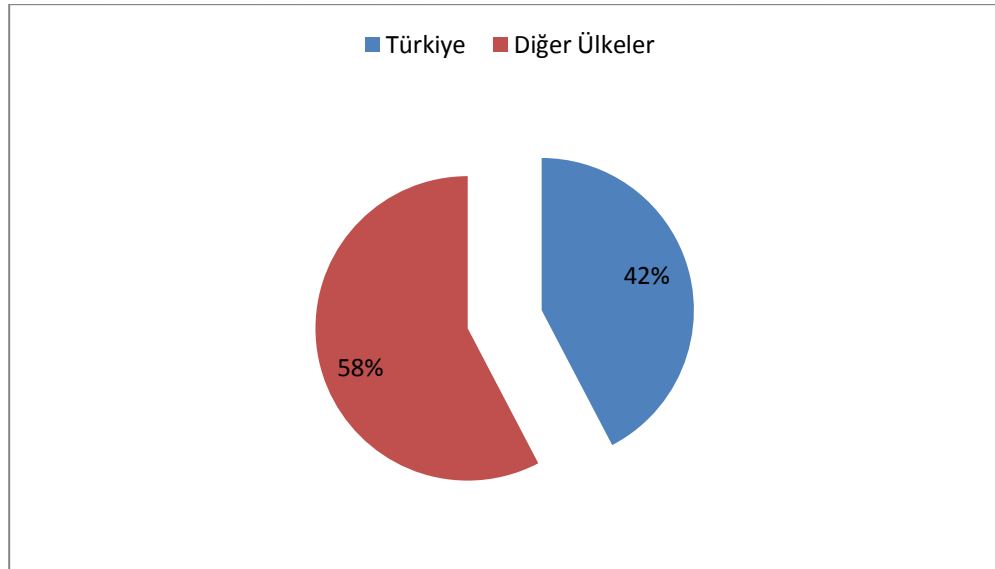
Çizelge 1.1. Türkiye’de Yetiştiriciliği En Çok Yapılan Balık Türlerinin Üretim Miktarları (Ton/Yıl) (Anonim, 2018a).

Yıllar	Alabalık			Çipura	Levrek
	İçsu	Deniz	Toplam		
2000	42.572	1.961	44.533	15.460	17.877
2001	36.827	1.240	38.067	12.939	15.546
2002	33.707	846	34.553	11.681	14.339
2003	39.674	1.194	40.868	16.735	20.982
2004	43.432	1.650	45.082	20.435	26.297
2005	48.033	1.249	49.282	27.634	37.290
2006	56.026	1.633	57.659	28.463	38.408
2007	58.433	2.740	61.173	33.500	41.900
2008	65.928	2.721	68.649	31.670	49.270
2009	75.657	5.229	80.886	28.362	46.554
2010	78.165	7.079	85.244	28.157	50.796
2011	100.239	7.697	107.936	32.187	47.013
2012	111.335	3.234	114.569	30.743	65.512
2013	122.873	5.186	128.059	35.701	67.913
2014	107.983	5.610	113.593	41.873	74.653
2015	101.166	6.872	108.038	51.844	75.164
2016	101.297	5.716	107.013	58.254	80.847

Türkiye’nin gerek üç tarafının denizlerle çevrili olması, gerek kıyı uzunluğunun 8333 km olması, daha da önemlisi deniz kültür balıkçılığına artan büyük ilgi ve yapılan yatırımlar levrek üretim potansiyelinde dünyada söz sahibi bir seviyeye gelmesini sağlamıştır (Şekil 1.1). Türkiye’nin tüm dünya genelinde toplam levrek üretimine katkısı % 42’lik bir oran ile ilk sıradadır (Şekil 1.1 ve 1.2) (Anonim, 2018b). Türkiye’nin toplam üretim kapasitesi detaylı incelendiğinde, en yakın üretimi yapan Yunanistan’ın yaklaşık iki katı miktarında bir üretime sahip olduğu görülmektedir.



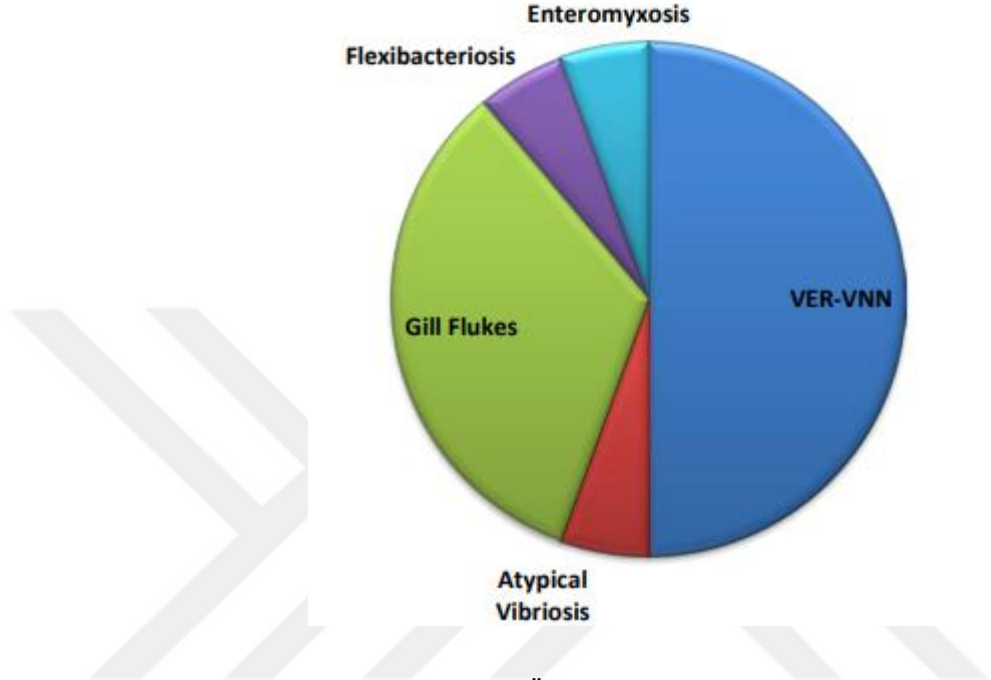
Şekil 1.1. FAO 2018 Yılı İstatistiklerine Göre Dünyada Levrek Üreten Ülkelerin Yıllık Üretim Miktarları (Yıl/Ton, Yıllık 1500 ton ve üzeri üretim yapan ülkeler hesaplanmıştır) (Anonim, 2018b).



Şekil 1.2. FAO 2018 Yılı İstatistiklerine Göre Türkiye'nin Dünya Levrek Üretimindeki Payı (2016) (Anonim, 2018b).

Deniz kültür balıkçılığında levrekleri etkileyen en önemli viral hastalığın Viral Nervöz Nekrozis (VNN)/Viral Ensefalopati ve Retinopati (VER) olduğu

bildirilmiştir. Deniz kültür balıkçılığında diğer bakteriyel veya paraziter hastalıklar da dikkate alındığında, VNN en önemli hastalık durumundadır (Şekil 1.3) (Vendramin, 2017). Sürdürülebilir bir levrek yetiştiriciliği açısından, tüm dünyada dikkatler VNN üzerine yoğunlaşmaktadır.



Şekil 1.3. 2016 Yılı Verilerine Göre En Önemli Tuzlu Su (Deniz) Hastalıkları (Vendramin, 2017).

1.1. Tarihçe

Nodavirus ismi ilk kez 1956 yılında Japonya'nın Nodamura köyü yakınlarında, petek güvelerinde (*Culex tritaeniorhynchus*) paraliz meydana getiren bir virusun keşfedilmesiyle kullanılmıştır ve diğer bilinen arboviruslardan farklı olan bu virus nodamura virus olarak adlandırılmıştır (Scherer ve Hurlbut, 1967).

Balıklardaki VNN salgını, ilk kez 1985 yılında meydana gelmiştir ve o tarihten itibaren su ürünleri sektöründeki önemi her geçen gün artmaktadır (Costa ve Thompson, 2016; Johansen ve ark., 2004). VNN, nöropatojenik bir hastalıktır ve bu yüzden ilk olarak sea bass viral encephalitis (SVE) olarak isimlendirilmiştir (Bellance ve Saint-Aurin, 1988).

VNN üzerine yapılan ilk çalışmalarda etken "picorna benzeri bir virus" olarak tanımlanmıştır (Breuil ve ark., 1991; Glazebrook ve ark., 1990). Virus, ilk olarak striped jack (*Pseudocaranx dentex*)’ten izole edilmesinden dolayı Striped Jack Nervöz Nekrozis Virus (SJNNVO) olarak adlandırılmıştır; virion büyüklüğü ve genom özellikleri de dikkate alınarak Nodaviridae ailesinin bir üyesi olarak sınıflandırılmıştır (Mori ve ark., 1992). Ancak daha sonraları başka deniz balıklarından da izole edilmiştir (Chi ve ark., 2001; Comps ve ark., 1994). Comps ve ark. (1994) tarafından yapılan bir çalışmada da Avrupa levreği (*Dicentrarchus labrax*) ve Asya levreğini (*Lates calcarifer*) etkileyen VNN salgınlarında yine bu nodavirus identifiye edilmiştir.

Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi (ICTV) tarafından 2000 yılında nodaviridae familyası içindeki viruslar, balıkları etkileyen nodaviruslar; Betanodavirus cinsi, bütün insektleri etkileyen nodaviruslar ise; Alfarnodavirus cinsi olarak iki cins şeklinde tekrar klasifiye edilmiştir (Ball ve ark., 2000). Betanodavirus, ayrıca Nervöz Nekrozis Virus (NNV) olarak ta anılmaktadır (Costa ve Thompson, 2016).

Hastalık ayrıca, Viral Nervöz Nekrozis (VNN) (Yoshikoshi ve Inoue, 1990), fish viral encephalitis (FVE) (Comps ve ark., 1994) ve viral ensefalitis ve retinitis (VER) (Tanaka ve ark., 2004) gibi farklı isimlerle adlandırılmıştır. Son olarak, OIE tarafından Viral Ensefalopati ve Retinopati olarak deklare edilmiştir (Anonim, 2017a).

1.2. Etiyoloji

1.2.1. Sınıflandırma

Betanodavirusların ilk tespiti ve izolasyonu yaklaşık olarak 30 yıl eskiye dayanmaktadır. Bu nedenle virusa ait taksonomik çalışmalar 1995’lerden sonra yapılmaya başlamıştır.

Striped jack türü balıklardan izole edilen nervous necrosis virus, Striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) olarak nodaviridae ailesi içinde nodavirus cinsi içinde ilk defa ICTV'nin 1995 yılındaki 6. Raporunda yer almıştır (Murphy ve ark., 1995).

Balıkları enfekte eden tüm nodavirusların ilk sınıflandırması ICTV tarafından, 1996 yılında Kudüs'te düzenlenen X.Uluslararası Viroloji Kongresinde gerçekleştirilmiştir. Onaylanan ilk sınıflandırmada bir cins ismi atanmamakta birlikte oluşturulan tanımlanmamış bu yeni cinse atanan viruslar içerisinde;

- Striped jack nervous necrosis virus (SJNNV),
- Tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV),
- Barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV),
- Japanese flounder nervous necrosis virus (JFNNV),
- Redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV),
- Dicentrarchus labrax encephalitis virus (DIEV),
- Lates calcarifer encephalitis virus (LcEV) bulunmaktadır.

Ayrıca SJNNV, tanımlanmamış bu cins içerisinde tip spesifik bir virus olarak kabul edilmiştir (Pringle, 1996). ICTV'nin 1997 yılında Strazburg oturumunda ise nodaviridae ailesi alphanodavirus ve betanodavirus olmak üzere iki cinse ayrılmıştır (Pringle, 1997). Özellikle balıkları enfekte eden viruslar; betanodavirus, özellikle insektleri enfekte eden viruslar ise alphanodavirus cinsi içinde yer almaktadır (Ball ve Jhonson, 1999; Schneemann ve ark., 1998; Van Regenmortel ve ark., 2000).

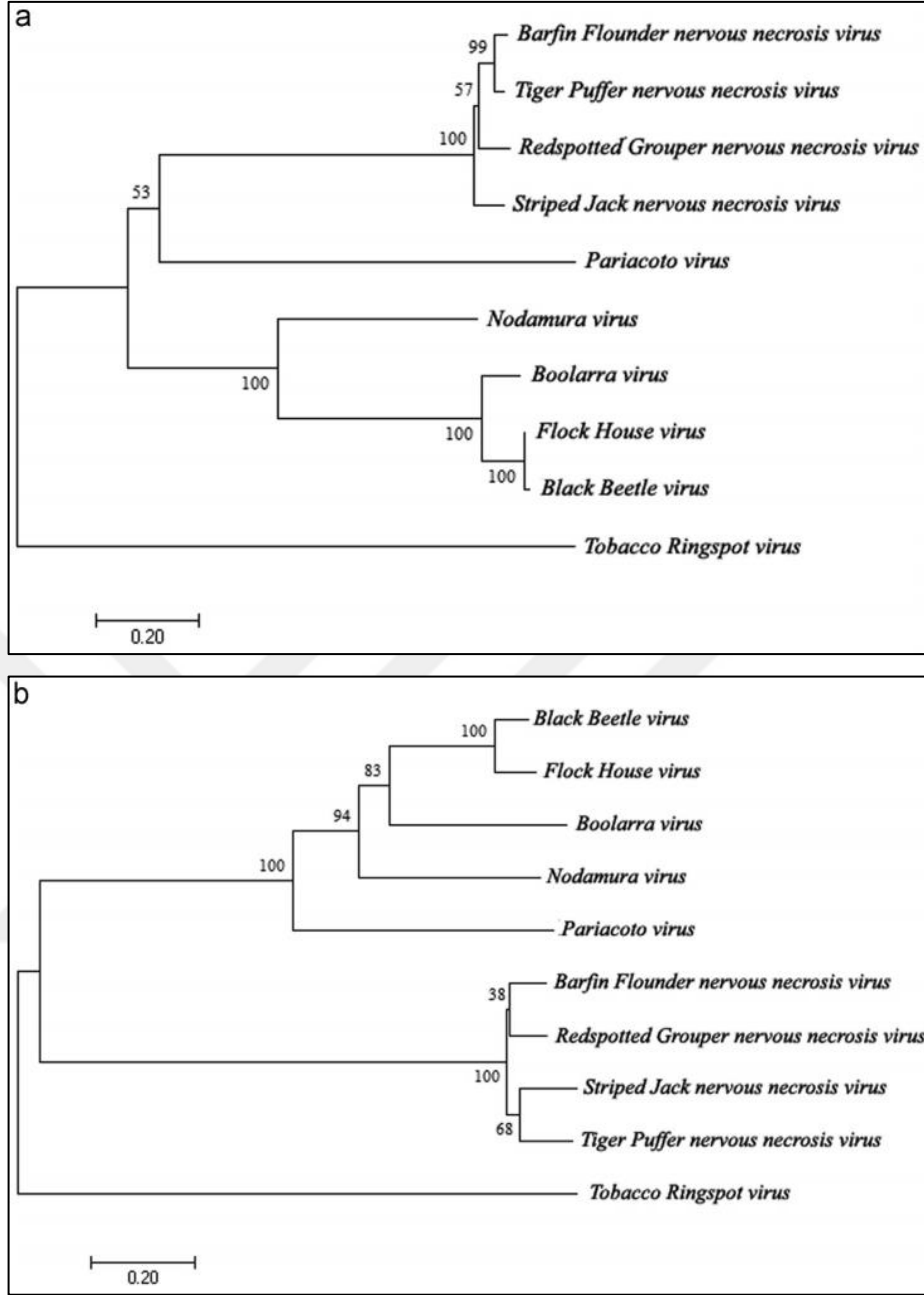
ICTV'nin 1995 yılındaki 6. Raporunda nodavirus cinsinde yer alan SJNNV, betanodavirus cinsinin kabul edilmesiyle birlikte ICTV'nin 1999 yılındaki 7. Raporunda bu cins içerisinde güncellenmiştir (Van Regenmortel ve ark., 2000).

Son olarak ICTV, 2017 yılı Singapur sonuç bildirgesine göre betanodaviruslar, sınıflandırılmamış virus takımları içerisinde; Nodaviridae ailesi içinde, betanodavirus

cinsi içinde dört virus türü olarak klasifiye edimiştir. Diğer cins olan alphanodavirus cinsi içerisinde ise toplam beş virus türü bulunmaktadır (Çizelge 1.2) (Anonim, 2017b). Chen-Fei ve Hamidun (2016) nodaviridae ailesindeki 9 virusun aralarındaki ilişkiyi moleküler düzeyde ortaya koymak amacıyla RNA1 ve RNA2 segmentlerinin tüm genom aminoasit dizilimlerine göre filogenetik ağaçlarını oluşturmuşlardır (Şekil 1.4).

Çizelge 1.2. Nodavirusların Genel Sınıflandırılması (Anonim, 2017b).

Takım	Aile	Cins	Tür
Tanımlanmamış	Nodaviridae	<i>Alphanodavirus</i>	<i>Black beetle virus</i>
			<i>Boolarra virus</i>
			<i>Flock House virus</i>
			<i>Nodamura virus</i>
			<i>Pariacoto virus</i>
		<i>Betanodavirus</i>	<i>Barfin flounder nervous necrosis virus</i>
			<i>Redspotted grouper nervous necrosis virus</i>
			<i>Striped jack nervous necrosis virus</i>
			<i>Tiger puffer nervous necrosis virus</i>

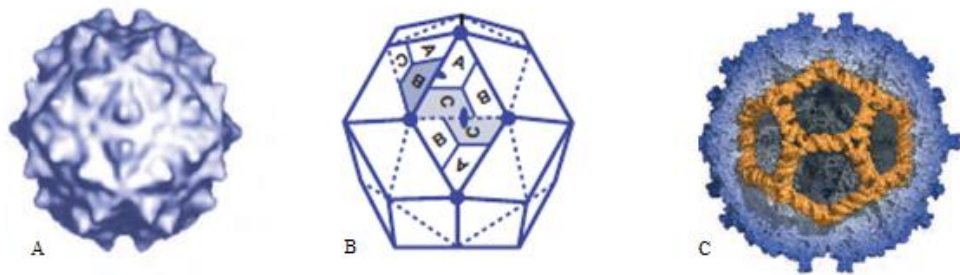


Şekil 1.4. Nodaviridae ailesinin RNA1(a) ve RNA2(b) tüm genom aminoasit analizine göre filogenetik yakınlıkları (Chen-Fei ve Hamidun, 2016).

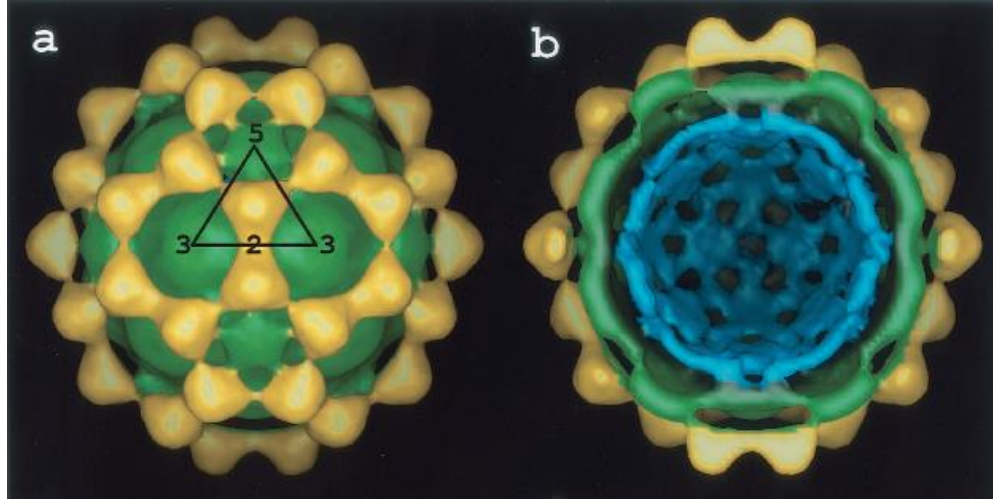
1.2.2. Virusun Yapısı ve Özellikleri

1.2.2.1. Morfolojik Yapı

Etken nodaviridae ailesi içinde betanodavirustur (Thiery ve ark., 2011). Betandavirusların ilk karakterizasyonu 1991’de elektron mikroskobu ile yapılmış, 23-25 nm çapında ve tipik bir ikosahedral simetriye sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak daha sonra CsCl gradyanlarında saflaştırılan virusun enine 26 nm, boyuna ise 29 nm ve cm^3 başına 1,30 g’lık bir çekme yoğunluğunda olduğu anlaşılmıştır (Breuil ve ark., 1991). Betanodaviruslar zarfsız, yuvarlak bir morfolojiye sahiptir (Johnson ve ark., 2003). Virion kapsidi, eş 180 kapsomerden oluşur (Şekil 1.5 A ve B). Benzer şekilde katlanmış üç kapsid proteinininden oluşan altmış üçgen birim, $T = 3$ simetrisi ile bir ikosahedral kafes oluşturur (Schneemann ve ark., 1998). Kapsid proteininin korunmuş C-terminal kalıntıları, iki katlı eksenlerde kapsid ara yüzeyini büyük oranda düzenleyen ve stabilize eden genomik RNA ile temas geçer (Şekil 1.5 C) (Fisher ve Johnson, 1993). Kapsid proteininin C-terminal kalıntıları RNA kapsüllemesi için gereklidir (Ventor ve ark., 2010). Herbir virionda 60 adet olmak üzere kapsid dış duvarından dışarı doğru yönelen çıkıntılar bulunmaktadır ve kapsid toplamının yaklaşık % 45’ini oluşturmaktadır (Şekil 1.6) (Tang ve ark., 2002).



Şekil 1.5. Nodavirus Virion Yapısı. A: $T=3$ Nodavirus Rekonstrüksiyon; B: Nodavirus ($T=3$) virionlarının alt üniteleri. Her alt ünite bir yamuk ile gösterilir. Toplam 180 kapsomerden oluşan, benzer şekilde katlanmış üç kapsid proteininin (A, B ve C) 60 alt ünitesi içerir; C: Virion içindeki genomik RNA'ların düzenlenmesi. Simetrik olarak düzenlenmiş sarmal RNA kabuğu (açık kahve), virionun iç yüzeyindeki kapsid proteinlerine (siyah) temas eder (Fields, 2013).

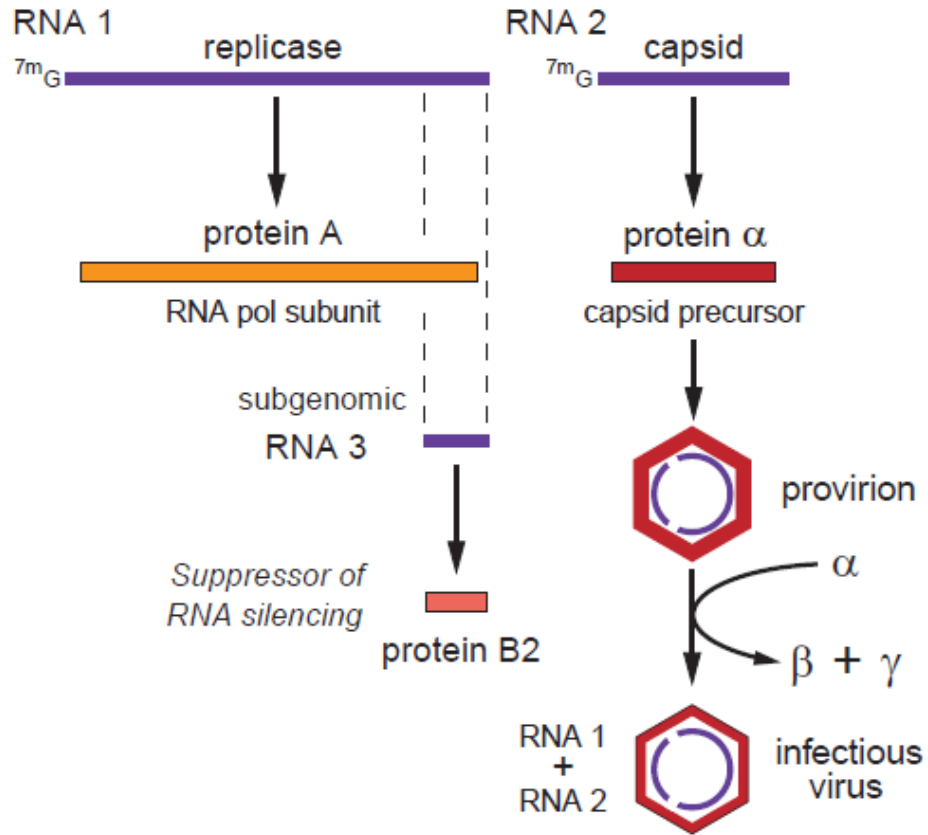


Şekil 1.6. Betanodavirus Cryoelektronmikroskopik Görüntüsü (23-Å çözünürlük): Protrüzyonlar (kapsid dış duvarından dışarı çıkıntılar); Sarı, Kapsid İç Duvarı; Yeşil, RNA; Mavi (Tang ve ark., 2002).

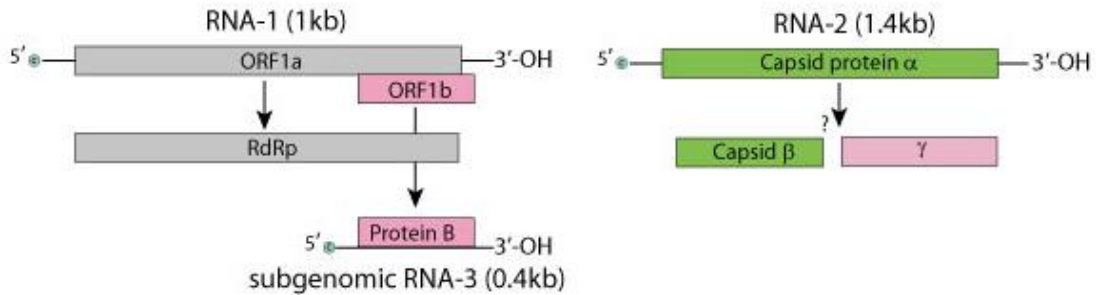
1.2.2.2. Genetik Yapı

Genom, tek iplikçikli, pozitif polariteli, üç açık okuma çerçevesi (Open Reading Frame-ORFs) içeren RNA1 ve RNA2 olmak üzere iki segmentten oluşur (Şekil 1.7 ve 1.8) (Anonim, 2018e; Fields, 2013; Johnson ve ark., 2003). Betanodavirus RNA'ları, 7-metil GpppN başlığı içerir, ancak 3' ucu bir poly (A) içermez. Her iki RNA'nın 3' uçları bilinmeyen bir yapı veya eklenmiş bir faktöre sahiptir (Hegde ve ark., 2003; Mori ve ark., 1992; Ventor ve ark., 2010).

Nodavirus genome organization



Şekil 1.7. Nodavirus Genom Yapısı (Alphanodavirus) (betanodavirusta protein α, oto-katalitik olarak, β ve γ bileşenlerine ayrılmaz). Pozitif anlamlı genomik RNA 1 ve 2, sırasıyla replikaz (protein A) ve kapsid öncü proteinini (protein α) kodlar. RNA 1 ayrıca, konakçı-hücre RNA susturmanın baskılayıcısı olan B2 proteinini kodlayan subgenomik RNA3 üretir. Kapsid ön maddesinden (α) bir araya getirilen proviruslar, β ve γ kapsid proteinleri üreten bir olgunlaşma yarılmassından geçer ve enfeksiyöz virionlar eş molar oranı olan genomik RNA 1 ve 2 içerir (Fields, 2013).



Şekil 1.8. Betanodavirus Genom Yapısı (Anonim, 2018e).

1.2.2.2.1. RNA1

RNA 1 (3,1 kb), otonom çoğaltma için gerekli tüm bilgileri taşır (Gallagher ve Rueckert, 1988). Viral komponent olan "protein A" yı kodlayan tek bir açık okuma çerçevesi (ORF) içerir. RNA1, moleküler ağırlığı 110 kDa olan RNA bağımlı RNA polimerazın (RdRp) sentezinden sorumludur (Nagai ve Nishizawa, 1999). RdRp, virus tarafından kodlanmış tek enzimdir (Ahlquist ve ark., 2003). RNA1 ayrıca virusun sıcaklığa duyarlılığının düzenlenmesinde de görev alır (Hata ve ark., 2010; Panzarin ve ark., 2014). RdRp, RNA1'in replikasyonu sırasında subgenomik RNA3 üretimini yönlendirir (Johnson ve ark., 2003).

RNA1'in uzunluğu ve kodladığı protein konakçı türüne bağımlıdır. RNA1, BFNNV'de 3100-3101; RGNNV'de 3103-3105; SJNNV'de 3107; TPNNV'de ise 3112 nt uzunluğundadır. Protein A, SJNNV'de 983 amino asit (aa), Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) (AHNNV)'ta 981 aa, greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) (GGNNV)'lerde 982 aa, TPNNV ise 982 aa'ten oluşmaktadır (Nagai ve Nishizawa, 1999; Okinaka ve Nakai, 2008; Sommerset ve Nerland, 2004; Tan ve ark., 2001).

1.2.2.2.2. RNA2

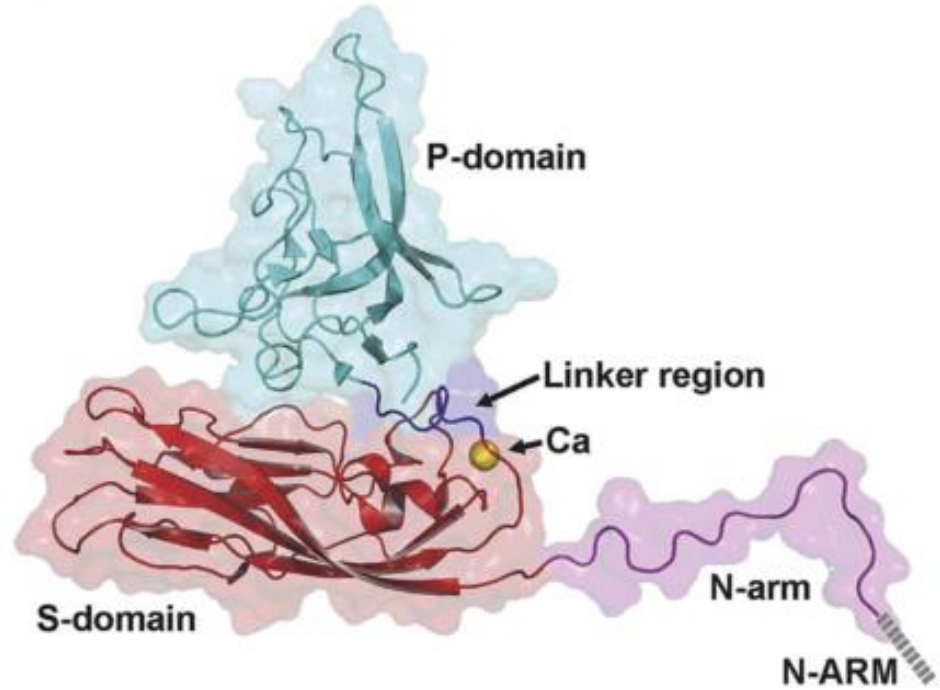
RNA2, 1410 bç uzunluğundadır ve 17-1036 nükleotid (nt) pozisyonlarında 340 aminoasitten oluşan kapsid proteinini (protein α) kodlayan 1023 bç tek bir ORF içermektedir (Johnson ve ark., 2003; Nishizawa ve ark., 1994; Nishizawa ve ark., 1995b). Protein α (37kDa), viral kapsid proteinlerinin proteolitik bir öncülüdür (Tan ve ark., 2001). RNA2 segmentinin uzunluğu da, virus suşuna göre değişmektedir. GGNNV 1433 nt, SJNNV 1410 nt, Sea Bass NNV (SBNNV) 1406 nt ve guppy *Poecilia reticulata* NNV ise sadece 1367 nt'tir. RNA2 boyutundaki farklılıklar, kapsid proteini (CP) boyutunu etkilemez, SJNNV dışındaki tüm genotiplerin kapsid proteini aynı büyüklüktedir. SJNNV ve TPNNV genotiplerinde iki amino asitlik fazlalık bulunmaktadır. Ancak ağırlık olarak tüm genotipler eşittir (Delsert ve ark., 1997; Hegde ve ark., 2003; Nishizawa ve ark., 1995b; Tan ve ark., 2001). BFNNV ve

RGNNV tipleri, 724'ten 729 a kadar olan altı bazlık nükleotid azlığı ile TPNNV ve SJNNV tiplerinden ayrılmaktadır ve kayıp diziler için tipik olmayan tekrarlayan diziler periferik olarak gözlenmiştir (Nishizawa ve ark., 1997). Kapsid proteini, SJNNV, TPNNV ve TNV'de 340; RGNNV ve BFNNV'de ise 338 aa'ten oluşmaktadır ve 42 kDa ağırlığındadır (Nagai ve Nishizawa, 1999; Okinaka ve Nakai, 2008).

Farklı betanodavirus genotiplerinin, RNA2 tarafından belirlenen tropizm ve immunreaktivite gibi çeşitli fenotipik özellikleri nasıl gösterdikleri bazı çalışmalar ile belirlenmiştir (Ito ve ark., 2008; Iwamoto ve ark., 2004; Panzarin ve ark., 2016). Panzarin ve ark. (2016), tarafından betanodavirusların antijenik çeşitliliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, bilinen dört genotipin antijenik özelliklerinin tekrar klasifiye edilmesinin yanı sıra reassortant virusların antijenik özelliklerinin ortaya konulması antijenik reaktivitede kapsid proteinlerinin rol oynadığı daha açık bir şekilde gösterilmiş ve RNA2'nin majör etkinliği ortaya konulmuştur. Ito ve ark. (2008), kapsid proteininin 695–765 nt (nükleotid) dizilerinin konakçı spesifitesinde rol oynadığını göstermişlerdir. Ancak Panzarin ve ark. (2012), tarafından yapılan çalışmada kullanılan farklı türlerin izolatlarında, RNA2' de belirgin bir değişiklik saptanmamıştır, farklılık tespit edilen RNA2'lerin orijinlerinin ise aynı veya benzer çiftlikler olması bu yaklaşıma karşı çıkmıştır. Farklı konakçı tropizmi için mutasyonların gerekli olmadığını, mutasyonlara ise balık çiftliklerine özgü çevresel ve çiftliksel (stres, yoğunluk, yeni balık girişleri vb.) özelliklerin neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Panzarin ve ark., 2012). Kapsid proteininin C-terminalinde meydana gelebilecek küçük değişikliklerin yeni konakçı kolonizasyonunda rol oynayabileceği bildirilmiştir (Oliveira ve ark., 2009). Kapsid proteininin 247 ve 270 aa pozisyonlarının virusun patojenitesinde büyük bir rol oynadığı gösterilmiştir (Souto ve ark., 2015c).

Kapsid proteininin topolojisi dört farklı bölgeye sahiptir; 1- N-terminal kolu (N-kolu, rezidü 34-51); 2-Shell domain (kabuk alanı) (S domain, rezidü 52-213); 3-bağlayıcı bölge (rezidü 214-220) ve 4-çıkıntı bölgesi (P-domain, rezidü 221-238) (Şekil 1.9). Ortaya çıkarılan topolojide N, S ve P domainleri üç majör domainlerdir

(Chen ve ark., 2015c). P-domaini, betanodavirusların konakçı spesifitesi için belirleyici iktiva eder, betanodavirusların dört farklı genotipe ayrılmasına sebep olan T4 değışken bölgesini kodlayan nt dizileri de P domaini içinde yer alır (Ito ve ark., 2008; Nishizawa ve ark., 1997). GGNNV kapsid proteininde ayrıca glikozillenme vardır (Chi ve ark., 2001). Tang ve ark. (2002), 217-388, Chen ve ark. (2015c), ise 214-388 aa pozisyonları arasındaki bölgede kapsid tabakasının dış kısmından bir P-domaini içinde kalan bir çıkıntının varlığı ortaya konulmuştur. Bu çıkıntının büyük ihtimalle antijen-antikor etkileşimlerinin meydana geldiği immunolojik bölge olabileceği öne sürölmüştür (Panzarin ve ark., 2016).



Şekil 1.9. GNNV-LP kapsid proteini C alt ünitesi şematize gösterimi. Grouper Nervöz Nekrozis Virus Benzeri Parçacık (GNNV-LP): Düzensiz N-Kolu (N-ARM, rezidü 1–33, gri), N kolu (N-arm, rezidü 34–51, mor), S Domain (S-domain, rezidü 52–213, kırmızı), Bağlantı Bölgesi (linker region, rezidü 214–220, mavi), P Domain (P-domain, rezidü 221–338, açık mavi) ve Ca^{2+} iyonları (sarı alan)(Chen ve ark., 2015c).

RNA2, kapsid proteininin yarısı C-terminalini kodlayan T4 çok değışken bölgesini içerir (Nishizawa ve ark., 1995b). T4 değışken bölgesi, genotiplerin klasifikasyonunda kullanılmaktadır (Nishizawa ve ark., 1997). Tang ve ark. (2002), N-terminal ucunun 1-82 aa pozisyonlarının viral replikasyonda virus oluşumu ve

RNA paketlenmesi sırasında viral nükleik asitin negatif yükünün nötralizasyonunda rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir. RGNNV ve SJNNV genotiplerinin in vitro eksprese edilmiş vahşi tip ve kimerik kapsid proteinlerinin immunoaktivite çalışması, kapsid proteinin C-terminalinin immünoreaktif kısmı muhafaza ettiğini göstermiştir (Panzarin ve ark., 2016).

1.2.2.2.3. RNA3

RNA3 (0.4 kb) olarak bilinen üçüncü transkript, viral replikasyon sırasında RNA1 terminusundan ayrılır ve hücre RNA sessizleşmesinin bir inhibitörü olan B2 (12 kDa) yapısal olmayan proteini kodlar (Fenner ve ark., 2006a; Iwamoto ve ark., 2005; Nagai ve Nishizawa, 1999). RNA3, viral RNA'nın konakçı hücrede toplanmasında görev alır (Fenner ve ark., 2006a; Iwamoto ve ark., 2005). Nodaviridae ailesinde RNA3, bir veya iki küçük yapısal olmayan proteini (B1 ve B2) kodlar ve farklı nodaviridae türleri, bu proteinleri kodlayan, bir veya her iki ORF'a da sahip olabilir. B1, 111 aa ve 11 kDa; B2 ise 75 aa ve 8,5 kDa'dur. Protein B1 kodlama bölgesi, protein A ile aynı okuma çerçevesindedir. Protein B2 kodlama bölgesi, protein A'ya göre + 1 okuma çerçevesindedir ve protein A'nın C terminalini hemen hemen tamamen örtüşmektedir (Huang ve ark., 2001). Her iki ORF'a sahip bazı nodaviruslarda, enfeksiyon sırasında sadece B2 bulunur (Cai ve ark., 2010). RNA3'ün uzunluğu, 371 nükleotittir (RNA1 dizisi içinde 2730 ve 3100 arası nükleotitlerde bulunur), B2'yi kodlayan 227 nükleotitten oluşan sadece 1 ORF mevcuttur (Iwamoto ve ark., 2005; Sommerset ve Nerland, 2004). Chen ve ark. (2009), B1 proteinin antinekrotik ölüm faktörü olduğunu ileri sürmüştür. Balık nodaviruslarında B2, erken enfeksiyon sırasında sitoplazmada lokalize olan yapısal olmayan bir proteindir (24 h.p.i) ve enfeksiyondan sonraki evrelerde (48 h.p.i) çekirdekte lokalizedir. Viral çift sarmallı RNA'nın (dsRNA) bağlanması ve korunması yoluyla ya kısa interfere RNA (siRNA) susturucu inhibitörü olduğu veya nekrotik bir ölüm faktörünün olduğu gösterilmiştir. B2 proteini, Val₄₄, Ile₄₅, Arg₅₂ ve Arg₅₃ kalıntılarının bu hedefleme için temel oluşturduğu mitokondriyal hedef motifi (⁴¹RTFVISAHAA⁵⁰) içerir (Chen ve ark., 2009; Fenner ve ark., 2006a; Fenner ve

ark., 2006b; Fenner ve ark., 2007; Iwamoto ve ark., 2005; Su ve Hong, 2010). B2 ifadesinin seviyeleri akut ve kronik olarak enfekte olmuş balıklar arasında farklıdır, kronik olarak enfekte olmuş balıklar B2 proteini içermez (Mézeth ve ark., 2009).

1.2.3. Virus Replikasyonu

VNN virusunun veya betanodavirusların replikasyon stratejisine ait bilgiler oldukça kısıtlıdır. Alphanodavirusların replikasyonu ile ilgili daha açık bilgiler olmasına rağmen (Şekil 1.7), betanodavirusların replikasyon şablonlarının daha iyi tanımlanması için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Virus, beyin, omurilik ve enfekte balıkların retinalarında çoğalırken, sağlıklı görünümdeki yabani deniz balıklarının iç organlarında da tespit edilmiştir (Gomez ve ark., 2004; Sakamoto ve ark., 2008).

Viral replikasyonun, pozitif polariteli diğer RNA viruslarında olduğu gibi hücre organellerinin membranlarını kullanarak gerçekleştirdikleri, betanodavirusların da mitokondride replike olduğu bildirilmektedir (Panzarin ve ark., 2014; Salonen ve ark., 2005). Protein A'yı kodlayan RNA1 nükleotidlerindeki mutasyonların, farklı genotip betanodavirusların, mitokondriyel lokalizasyon, membran affinitesi, RNA toplanması, stabilite ve Protein A konak hücre etkileşimlerini etkileyerek farklı çevresel koşullar ve farklı sıcaklıklarda replikasyon titrelerini etkileyebileceği ortaya konulmuştur (Panzarin ve ark., 2014). RNA1'in 1-445 aa pozisyonlarındaki protein A'nın sıcaklık sensitivitesinde rol aldığı, farklı sıcaklıkların protein A'nın mitokondriyal membrana transferini etkilediği ortaya konulmuştur (Hata ve ark., 2010). RNA1'de bulunan bu mutasyonların farklı genotiplerin farklı sıcaklıklara (15-30°C) nasıl adapte olarak salgınlar ortaya çıkarabildiklerini daha iyi açıklamaktadır.

Dragon grouper nervous necrosis virus (DGNNV) kullanılarak yapılan bir çalışmada; virusun konakçı hücrelere endositoz yoluyla girdiğine ve konak

hücrelerin yüzeyinde siyalik aside bağlandığına inanılmakla birlikte, konakçıya viral giriş ve enfeksiyonun biyolojik yolu ve dahil olan hücre reseptörleri hala belirsizdir. Aynı çalışmada tunicamicin inhibisyonu ve nöraminidaz uygulaması ile makropinositozis varlığında, virion internalizasyonunun spesifik reseptör aracılı bir proses izlediği bildirilmiştir. Virion makropinositozisinin hücre membranında içeri çoklu büzülmeler ve bunların birleşmesiyle gerçekleştirdiği yüksek titredeki virus, in vitro olarak gösterilmiştir. Ancak düşük doz enfeksiyonda nasıl bir internalizasyon sağlandığı belirsizdir (Liu ve ark., 2005). Enfeksiyonun patogenezinin aydınlatılması için yapılan başka bir çalışmada, GHSC70 (ısı şoku kökenli protein 70) potansiyel bir reseptör veya ko-reseptör olarak tanımlanmış ve grouper NNV kapsidi ile etkileştiği gösterilmiştir ve bu etkileşimin enfeksiyonun erken evrelerinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Chang ve Chi, 2015).

RNA1 tarafından sentezlenen RdRp, RNA şablonu ve başlatma alanlarının seçimi, RNA sentezi ve üretilen RNA'ya 5' uçlarının eklenmesi veya 3' poliadenilat eklenmesi işlevlerinden sorumludur (Ahlquist ve ark., 2003). Su ısısının, virusun replikasyonu için gerekli olan RdRp enziminin aktivitesini etkilediği, bu durum da farklı genotiplerin epidemisi için farklı optimum ısılara gereksinim olduğu bildirilmektedir (Liu ve ark., 2015). Virusun sıcaklığa duyarlılığının belirlenmesinde RNA1'in etkisinin kanıtlanmış olmasına rağmen (Panzarin ve ark., 2014), Hata ve ark. (2010), hem RNA1'in hem de RNA2'nin sıcaklık duyarlılığında bir rol oynadığını ve bu sıcaklığın viral RNA replikasyonunu etkilediğini, ancak konakçı hücrelere virion stabilitesi veya virion eklentisi üzerinde önemli bir etkisi olmadığını bildirmişlerdir.

Greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) nervöz nekrozis virus (GGNNV) ile yapılan bir çalışmada, RNA2 tarafından sentezlenen protein α 'nın hücre apoptozisini indüklediği ve bu şekilde viral partiküllerin saçılmasını sağladığı gösterilmiştir. Çalışmada, protein α hem çekirdek hem sitoplazmada tespit edilmiş; sitoplazmadaki işlevinin apoptozisi indükleyebileceği tahmin edilirken, bazı proteinlerin çekirdek lokalizasyonları apoptozis ile ilişkilendirilememiştir (Guo ve ark., 2003a; Guo ve ark., 2003b). Protein α , kapsit proteininin öncülüdür ve viral birleşim için önemli bir

unsurdur (Guo ve ark., 2003a). Alphanodavirusta protein α , oto-katalitik olarak, β ve γ olgun kapsit protein alt birimlerini oluşturmak için ayrılırken, betanodavirusta bu ikili oluşum, 187 ve 201 sisteinler arasındaki bir intramoleküler disülfid bağının formasyonunundan dolayı, oto-katalizin bir sonucu olarak ortaya çıkmaz (Gallagher ve Rueckert, 1988; Krondiris ve Sideris, 2002). Sistein 201'in, sistein 115 ile birlikte virus partikülünün ısı stabilitesi ve kapsit formasyonu için gerekli olduğu tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2010). Aspartik asit kalıntılarının kapsid proteininin parçalanması, kalsiyum iyonları ile ilişkili olarak ta ısı stabilitesi, trimerizasyon ve kapsid birleşmesinin sağlanması da çok önemli rolleri vardır (Grotmol ve ark., 2000; Wu ve ark., 2008b). Kapsid proteininin N-terminal ucu, dokuz arjinin ve altı lizinden oluşan temel amino asitler bakımından zengindir ve RNA genomunun kapsid i duvarına bağlanması katıldığı düşünülmektedir (Fisher ve Johnson, 1993).

Karaciğer, böbrek, sindirim kanalı, kalp, dalak, bağırsak, gonad sıvıları, yüzgeç ve solungaçlarda, Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), in situ hybridization (ISH), real-time nucleic acid sequence based amplification (NASBA), quantitative PCR (qPCR veya real time PCR) ve loop-mediated isothermal amplification (LAMP) veya real-time LAMP gibi teşhis metotları ile virusun (RNA-1 veya 2) tespit edilmesine rağmen, viral RNA'nın enfektif olup olmadığının belirlenemediği bildirilmiştir. Ayrıca bu dokulardaki viral yükün çok düşük olduğu ve enfeksiyon döneminde bile 10 kattan daha az bir artış gösterdiği, bu durumun da virusun nöronal olmayan dokularda bulunmasına rağmen viral replikasyonu meydana getiremediği öne sürülmüştür (Lopez-Jimena ve ark., 2011). Ancak başka bir çalışmada, virusun levrek ve ipura testislerinde replike olduğu gösterilmiştir (Valero ve ark., 2015b).

1.2.4. Genetik ve Serolojik Farklılıklar

Betanodavirus izolatları arasında gözlenen konakçı spesifitesinden kapsid proteini sorumludur. Daha belirgin olarak bu özėüllük T4 değişken bölgesi içine

lokalize olmuştur (Guo ve ark., 2003a; Ito ve ark., 2008). Betanodaviruslar, RNA2 segmentinin T4 değişken bölgesinin filogenetik analizine göre ilk olarak dört major genotipte gruplandırılırlar. Bunlar striped jack nervous necrosis virus (SJNNV), tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV), barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV) ve red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV)'tur. Johansen ve ark. (2004) tarafından bir kalkan (*Scophthalmus maximus*) betanodavirus suşunu içeren yeni bir genotip; Turbot Nervöz Nekrozis Virus (TNV) önerilmiştir. Bununla birlikte, bu genotipler türlere özgü olmaktan ziyade belli bir su sıcaklığı aralığı ile ilişkili olma eğilimindedir (Costa ve Thompson, 2016). Farklı genotipler, farklı konakçı türleri ve optimum invitro gelişme sıcaklıklarına sahiptir (Iwamoto ve ark., 2000; Mori ve ark., 2003).

İdentifiye edilen genotipler, poliklonal antikorlar ile yapılan virus nötralizasyon testiyle üç farklı serotiple ilişkilendirilmiştir. SJNNV ve RGNNV/SJNNV viruslarını içeren A serotipi, TPNNV genotipinden oluşan B serotipi ve son olarak BFNNV, RGNNV ve SJNNV/RGNNV suşlarını kapsayan C serotipini içeren ve kısmen de çapraz reaksiyon veren üç farklı serotipe ayrılabilirler (Iwamoto ve ark., 2000; Mori ve ark., 2003; Nishizawa ve ark., 1997). Ancak Panzarin ve ark. (2016), tarafından yapılan son çalışmada, Mori ve ark. (2003), tarafından bildirilenin aksine BFNNV genotipi C değil, B serogrubunda değerlendirilmiştir. Farklılığın nedeninin ise; Mori ve ark. (2003), tarafından yapılan çalışmada serolojik farklılıkların değerlendirilmesinde kullanılan 1/r eşik değerinin 20, Panzarin ve ark. (2016), tarafından kullanılan 1/r eşik değerinin ise 10 olması gösterilmiştir. Farklılığa paralel olarak Mori ve ark. (2003), tarafından yapılan çalışmada aralığın fazla olması durumunda BFNNV ile TPNNV çapraz reaksiyon vermiştir. Panzarin ve ark. (2016), tarafından BFNNV serogruplandırma değerleri incelendiğinde hem A hem C grubundan biraz farklı olduğu görülmektedir. Bir bütün olarak iki çalışma değerlendirildiğinde, Panzarin ve ark. (2016), hem çalışmada kullanılan 1/r eşik değerinin daha uygun olması hem de çalışmada kullanılan izolatların daha geniş bir coğrafi dağılım göstermesinden dolayı yeni serogruplandırmanın Serogrup-A: SJNNV, RGNNV/SJNNV; Serogrup-B: TPNNV, BFNNV; Serogrup-C: RGNNV, SJNNV/RGNNV olması gerektiği ileri sürülmüştür.

Farklı çalışmalar, SJNNV-poliklonal antikorların diğer genotiplerle çapraz reaksiyon verebildiğini göstermiştir, bu da betanodavirusların ortak epitoplara veya antijenik bölgelere sahip olduğunu öne sürmüştür (Iwamoto ve ark., 1999; Munday ve ark., 1994). Ancak SJNNV-poliklonal veya RGNNV-poliklonal antikorlar kullanılarak yapılan çalışmalarda farklı genotipler arasında çapraz nötralizasyon olmadığı gösterilmiştir (Skiris ve ark., 2001). RGNNV ve SJNNV antijenik çeşitliliğini sırasıyla 217–256 ve 257–341 amino asit (aa) dizilerinde ihtiva etmektedir. Reverz genetik kimerik virusların nötralizasyonu ile, bu alanların nötralizan epitoplara sahip olduğu gösterilmiştir (Panzarin ve ark., 2016).

RGNNV ve SJNNV genotiplerinin konakçı tropizmi ile ilgili belirleyici bölgeler sırasıyla 694-758 ve 695-765 nt dizileridir. RGNNV genotipinin immunoreaktif bölgesi ise konakçı tropizm dizilerini de içine alan 675-795 nt dizileridir. Bunun aksine SJNNV immunonoreaktif bölge 796-1023 nt pozisyonları ile konakçı tropizm bölgesinden farklılık göstermektedir. Bu iki genotipte gözlenen gerek yapısal gerek fonksiyonel farklılığın, iki genotipin patojenite farklılığı ve tür farklılığı ile ilgili olabileceği bildirilmiştir (Panzarin ve ark., 2016).

Betanodavirusların genotipik ve serolojik sınıflandırmaları, duyarlı balık türleri ve optimum gelişme sıcaklıkları Çizelge 1.3'te gösterilmektedir. Farklı genotipler ve bu genotiplerin optimum gelişme ısılarında bir korelasyon olduğu in vitro olarak gösterilmiştir (Iwamoto ve ark., 2000). Tabloda gösterilen balık türlerinden levrek (european sea bass - Avrupa Deniz Levreği) ile betanodaviruslar için taşıyıcı olarak kabul edilen çipura üretimi ülkemizde yaygındır.

Çizelge 1.3. Betanodavirusun genotipik ve fenotipik sınıflandırılması (Iwamoto ve ark., 2000).

Genotip	Serotip	Hedef Konakçı Balık	Optimum Gelişme Sıcaklığı
SJNNV	A	Striped jack (Çizgili levrek, kral balığı)	20-25 °C
TPNNV	B	Tiger puffer (Fugu)	20 °C
BFNNV	C	Soğuk Su Balıkları: Atlantik halibut, Atlantik cod, flounders (pisi balıkları), vb	15-20 °C
RGNNV	C	Ilık Su Balıkları: Asian sea bass (barramundi-Asya levreği), European sea bass (levrek) , groupers (orfoz, lahos, hani vs.)	25-30 °C

Bu gruplandırmadan farklı olarak, 2004 yılında konak balık türü ile ilişkili olmayan başka bir nomenklatür önerilmiştir. Betanodavirus genotiplerini basitçe I, II, III ve IV (sırasıyla RGNNV, BFNNV, TPNNV ve SJNNV) olarak gruplandırmıştır ve bu sistem alt gruplandırma yapmaya da izin vermektedir. Bu sınıflandırmada genotip II (BFNNV), atlantik morina balığı (IIa), the Barfin flounder (IIb) ve Atlantik halibut/Fransız Avrupa deniz levreği izolatları arasındaki genetik farklılığı göstermek amacıyla üç alt gruba (a, b ve c) ayrılmaktadır. Bu sistemde TNV, genotip V olarak değerlendirilmektedir (Cutrín ve ark., 2007; Moody ve ark., 2009). TPNNV clusteri, sadece tek bir balık (Tiger puffer) içeren tek clusterdir. Takifugu cinsinde diğer balıklardan izole edilen betanodaviruslar, bu cluster içinde değil RGNNV clusterinde gruplandırılırlar (Liu ve ark., 2015).

1990-1995 yıllarında aynı yerden izole edilen beş SJNNV genotipi izolatın bazlarındaki mutasyon; nükleotid yer değiştirme/yer/zaman değişkenleri ekseninde Li ve ark. (1988)'nin metodu ile $2,6 \times 10^{-3}$ moleküler değişim oranı olarak hesaplanmıştır. Bu hesaptan hareketle balık nodaviruslarının dört büyük kümesinin 100-150 yıllık süreçte değişim gösterdiği ileri sürülmüştür (Nishizawa ve ark., 1997).

1.2.5. Reassortment

Balık nodavirusları, genomlarının segmentli olmasından dolayı, reassortant virusların oluşumuyla sonuçlanan genetik shiftler oluşturabilirler. Betanodaviruslardaki reassortmentin yeni konakçılara adaptasyonda ve kolonizasyonda rol oynadığı bildirilmiştir (Oliveira ve ark., 2009; Panzarin ve ark., 2012; Toffolo ve ark., 2007). Bugüne kadar, genotip adlandırmalarını polimeraz/kapsid protein genlerinin (sırasıyla RNA1/RNA2) genotipik yapılarından alan, RGNNV/SJNNV veya SJNNV/RGNNV reassortant suşları tanımlanmıştır (Oliveira ve ark., 2009; Panzarin ve ark., 2012). Her iki reassortant tipinin de tespit edilmesine rağmen, RGNNV/SJNNV reassortantının daha yaygın seyrettiği tespit edilmiştir (Ne'varez ve ark., 2005; Oliveira ve ark., 2009; Panzarin ve ark., 2012). SJNNV/RGNNV reassortantının levrekleri, RGNNV/SJNNV reassortantının ise

Çipura ve Senegalese sole (dil balığı) türü balıklarda salgınlara neden olduğu bildirilmiştir (Oliveira ve ark., 2009).

Betanodavirus sınıflandırmasını daha karmaşık hale getiren bu reassortant durum, aynı balığın hem SJNNV, hem RGNNV genotipi ile enfekte edilmesiyle gösterilmiştir (Lopez-Jimena ve ark., 2010). Genotipler arası reassortant oluşumu şimdiye kadar SJNNV ve RGNNV genotiplerinde tespit edilmiştir (He ve Teng, 2015). Bu reassortment durumlarının varlığı, betanodavirus teşhisinde her iki segmentin de dikkate alınması gerekliliğini ortaya koymuştur (Costa ve Thompson, 2016). Reassortant oluşumu, segmentli RNA viruslarına özgü bir durumdur ve virusun daha hızlı evrimini sağlayan bir mekanizma sağlar. Bu mekanizma virusun yeni konaklara bulaşmasına ve konağın immun yanıtından kaçmasına sebep olarak daha büyük salgınlara oluşturur (He ve Teng, 2015; Vijaykrishna ve ark., 2015). Reassortant RGNNV/SJNNV'nin RNA2 genomu, SJNNV'nin RNA2 genomundan değişiklik gösterir. SJNNV, Avrupa levreklerinde hastalığa neden olamazken, RGNNV/SJNNV reassortantının bu türlerde klinik belirtiler ve mortaliteleri indükleyebileceği ancak mortalite oranının tekli RGNNV enfeksiyonuna göre daha az olduğu bildirilmiştir. RGNNV, SJNNV ve reassortant RGNNV/SJNNV'nin hepsi Senegalensis sole'lerde yüksek mortalitelere neden olur, ancak reassortant virus mortalitesi daha fazladır ve challenge uygulamasında tüm balıkları enfekte ederek, çok şiddetli semptomlar ile birkaç gün içinde ldrebilmektedir (Souto ve ark., 2015b). RGNNV ve RGNNV/SJNNV reassortantının RNA2 segmentleri karşılaştırıldığında, 247 ve 270 amino asitlerinin, reassortant betanodavirusun enfektivitesinde rol oynayabileceği ortaya konulmuştur (Oliveira ve ark., 2009). RGNNV/SJNNV mutantlarıyla, RNA2'deki 247 ve 270 pozisyonadaki amino asitlere özgü mutasyonlarla yapılan enfektivite denemelerinde, yabani reassortant virus ile enfektelere oranla, Senegalensis sole mortalitelerinde önemli bir azalma olduğu gösterilmiştir (Souto ve ark., 2015b). Vahşi tip RGNNV/SJNNV reassortantı, RNA1'in sıcaklığa duyarlı bölgesinde (aa 1-445) altı amino asit değişikliğine sahiptir ve Senegalensis sole'u enfekte edebilmek için 18-22 C gibi farklı bir sıcaklık aralığı gereklidir, sıcaklığın 16 C gibi bir seviyeye inmesi virus replikasyonunu azaltmış,

buna bağılı olarak ta mortaliteler % 100'den % 8'lere kadar gerilemiştir (Souto ve ark., 2015a).

Souto ve ark. RGNNV/SJNNV suşunun 247 ve 270 aa pozisyonlarının (Ser247; Ser270) Senegalese sole ve kalkan'larda virulansın belirlendiğı iki bölge olarak tanımlamışlardır (Souto ve ark., 2015c; Souto ve ark., 2016). Bu bölgelerin çipuralar için de virulansı belirlediğı saptanmıştır. Çipuralardan farklı zamanlarda ve farklı epidemiyolojik birimlerden elde edilen izolatların da benzer genetik yapı gösterdikleri bildirilmiştir (Toffan ve ark., 2017).

Hemen hemen tüm RGNNV/SJNNV mutantların, büyük olasılıkla 1980'lerin başlarında Güney Avrupa'da meydana gelen tek bir reassortant olayının sonucunda ortaya çıktığı ortaya konulmuştur. Ayrıca intra-genotip reassortments durumları da gözlenmiştir. Avustralya'da, iki ayrı RGNNV alt tipinden RNA1 ve RNA2 genlerinin reassortantı sonucu bir izolat bulunurken, Malezya'da daha eski bir RNA2 geni ve daha genç RNA1 geninden oluşan bir betanodavirus saptanmıştır (He ve Teng, 2015). Son yıllarda çipuralarda RGNNV/SJNNV ile ilişkili hastalık raporlarının sayısındaki artış, Akdeniz çipura yetiştiriciliğinde reassortant bir durumun ortaya çıkabileceğini ve bunun bir problem oluşturabileceğini düşündürmektedir (Toffan ve ark., 2017).

Daha önceden çipuralardan izole edilen betanodavirusların genetik karakterizasyonlarında, çoğunun gerçekten RGNNV/SJNNV reassortant suş oldukları ortaya çıkarılmıştır. Bu durumlar birlikte değerlendirildiğinde, çipuralara belirli bir tropizme sahip RGNNV/SJNNV betanodavirusların, Akdeniz kültür balıkçılığı için yeni ve beklenmedik bir tehdit olduğunu güçlü bir şekilde desteklemektedir. Reassortant RGNNV/SJNNV'nin özellikle çipura larva ve postlarvaları için yüksek virulens ve spesifik tropizm gösterdiği bildirilmiştir. Reassortant RGNNV/SJNNV salgınlarının görüldüğü çipura çiftliklerinin yanında bulunan levreklerde herhangi bir klinik semptom ve taşıyıcılık görülmemiştir (Toffan ve ark., 2017). GenBank'dan alınan reassortant RGNNV/SJNNV nükleotid dizilerinin filogenetik analizleri, bu virusun en sık tespit edilen türünün çipuralar

olduğunu ve virusun bu türe adaptasyonunu açıklamaktadır. Çipuralarda ayrıca RGNNV veya SJNNV/RGNNV suşları da sporadik olarak tespit edilmiştir (Toffan ve ark., 2017).

1.2.6. Etken Stabilitesi

1.2.6.1. Çevresel Dayanıklılık

Betanodavirusların hem tatlısu ortamına, hem deniz suyu ortamına yüksek dayanıklı olduğu, ayrıca dış ortamda da yüksek dirençli oldukları bildirilmiştir (Vendramin ve ark., 2012). Betanodaviruslar, akuatik çevrede oldukça dayaklıdırlar, 25 °C ve daha fazla su sıcaklığında canlılıkları önemli oranda etkilenirken, düşük deniz suyu sıcaklığındaki deniz suyunda uzun süre canlı kalabilir (Frerichs ve ark., 2000).

Farklı betanodavirus suşlarının farklı sıcaklıklarda stabilitelerinin ve enfektivitelerinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur (Hata ve ark., 2007; Hata ve ark., 2010; Panzarin ve ark., 2014). Optimum 25-30 °C’de gelişim gösteren RGNNV genotipinin 35 °C’ye kadar enfektivitesini koruyabildiği, 37 °C’de is enfektivitesinin tamamen kaybolduğu; hem virus çoğalmasının hem viral RNA replikasyonunun olmaması ile gösterilmiştir. Bu durum çiğ yenebilen balıkların betanodavirus ihtiva etseler bile, insanlar için bir risk taşımadığını göstermektedir (Hata ve ark., 2007). Öte yandan 20-25 °C’de optimum gelişim gösteren SJNNV genotipinin 15 °C’deki üreme kinetiğinin düşük olmasına rağmen, RGNNV’den daha iyi ve uyumlu olduğu gözlenmiştir (Panzarin ve ark., 2014).

Betanodavirus ile enfekte balıklar, bir salgını takiben oluşan akuatik çevre kontaminasyonunda, yabani duyarlı türler için bir enfeksiyon kaynağı olarak uzun süre etkisini devam ettirir. Donmuş balıklarda da uzun süre persiste kalabilir ve bu balıkların beslenme için hammadde olarak kullanılması potansiyel bir risk ortaya koyar (Mori ve ark., 2005). Betanodaviruslar akuatik çevre dışında

sitopatojenitelerini kolayca kaybedebilir gibi görülmektedir. 21 °C de 7 günlük periyotta, kuru koşullarda > % 99 inaktivasyon gözlenmiştir (Maltese ve Bovo, 2007).

1.2.6.2. Kimyasal Dayanıklılık

Formalin zayıf aktivite gösterirken, sodyum hipoklorit, iodin, hidrojen peroksit ve benzolkonyum klorid gibi yaygın olarak kullanılan dezenfektanlar inaktivasyon için çok yararlıdır (Frerichs ve ark., 2000). Yumurta kabuğu yüzeyindeki virus kontaminasyonunu azaltmak veya bu durumdan kaçınmak için ayrıca ozon kullanılmaktadır (Grotmol ve Totland, 2000), virusla kontamine sular UV ile etkin olarak sterilize edilebilir.

1.3. Epidemiyoloji

1.3.1. Bulaşma

1.3.1.1. Horizontal Bulaşma

Su en önemli abiyotik vektör olarak düşünülmektedir. Virusun çevredeki sudan horizontal geçiş, sudan saflaştırılmış nodavirus partiküllerinin canlı olarak tespit edilmesiyle teyit edilmiştir (Arimoto ve ark., 1993a; Arimoto ve ark., 1993b; Breuil ve ark., 2002). Betanodaviruslar klinik bir salgın sırasında bir çiftlikten diğerine su, kontamine personel, ağlar, çizme ve diğer ekipmanlar ile kolayca bulaşabilir. Özellikle kuluçkahanelerde yeterli biyogüvenlik önlemleri alınmalıdır (Mori ve ark., 1998). Açık denizlerde akıntılar, devamlı akıntılar, botlarla farklı çiftliklerin ziyareti ve göç halindeki yabancı balıklar tarafından bir çiftlikten diğerine geçebilmektedir (Anonim, 2017a). Yabancı popülasyondaki rezervuarların varlığı çiftlik popülasyonlarındaki enfeksiyonun ana kaynağı olarak oldukça makul düzeydeyken,

enfekte juvenil populasyonlar enfeksiyonun çevredeki virus partiküllerinin büyük bir sayıya ulaşmasında en yaygın yoldur (Johansen ve ark., 2004).

Aseptomatik balıkların veya salgınların olduğu işletmelere yakın bulunan işletmeler risk altındadır (Athanasopoulou ve ark., 2004). Çipuralar, aynı sistemler veya lokasyonlarda yetiştirilen levrekler için rezervuar olarak bilinmektedir (Castric ve ark., 2001). Doğal enfeksiyon geçiren ve hayatta kalan Atlantik Halibutların, enfeksiyondan bir yıl sonra bile virus taşıyıcısı ve saçıcısı olduğu bildirilmiştir (Johansen ve ark., 2004).

Virusun asit koşullara ve 37 °C'ye yüksek direçli olmasından dolayı (Frerichs ve ark., 2000) balıkçıl kuşlar da potansiyel vektör olarak değerlendirilmelidir. Daha da kötüsü kontamine bölgelerden orijin alan yumuşakçalar da büyük ticaret hacminden dolayı dikkate alınmalıdır (Anonim, 2017a). Enfekte bir çiftliğe yakın bir yerden toplanan Nereidae ailesi Nereis genusunda bulunan kum solucanlarında virus tespit edilmiştir (Bovo ve ark., 2011). Büyük uluslararası bir pazara sahip olan olta solucanlarının da betanodavirusların bir bölgeden diğer bir bölgeye taşınmasında çok riskli bir duruma sahip olmaları göz önünde bulundurulmalıdır (Anonim, 2017a).

Yumuşakçaların akuatik virusların potansiyel bir rezervuarı olabileceği bildirilmiştir (Gomez ve ark., 2010; Panzarini ve ark., 2012). Yumuşakçalar betanodavirusların ayrıca doğal rezervuar ve muhtemel taşıyıcıları olarak işlev görürler. Betanodaviruslar, sağlıklı görünüşte yabani ve çiftlik omurgasızlarından çift kabuklular (midye; *Mytilus galloprovincialis* ve istiridye; *Ruditapes philippinarum*), kabuklu (karides; *Pandalus hypsinotus*, yengeç; *Charybdis bimaculata*, dikenli ıstakoz; *Pamulirus versicolor* veya karındanbacaklı; *Opisthobranchia*) gibi yumuşakçalarda tespit edilmiştir (Gomez ve ark., 2008a; Gomez ve ark., 2008b). *Artemia* (*Artemia salina*) ve rotiferlerin (*Brachionus plicatilis*) de betanodaviruslar için kısa süreli olarak mekanik vektör olabileceği ileri sürülmüştür (Skliris ve Richards, 1998).

Betanodavirusların horizontal yolla bulaşmasını destekleyen bir çalışmada, Berzak ve ark. (2019), tarafından Akdeniz’de İsrail kıyılarında yabancı popülasyonlarda virus tespit edildikten 120 gün sonra, bir çipura çiftliğinde de aynı virus tespit edilmiştir. Virus çipuraların yetiştirildiği kuluçkahanede ve denize yetiştirilmeye gönderildikten 7 gün sonra ise saptanmamıştır.

Hastalık konakçada tekrar aktivasyon, dalma ve enjeksiyon ile oluşabilir (Munday ve ark., 2002). Horizontal bulaşma sahada sıklıkla gözlenmektedir ve kontamine su aracılığıyla hastalık bulaşmasının en yaygın yol olduğu düşünülmektedir. Ayrıca enfekte larvalardaki yüksek viral yük ve biyogüvenlik önlemlerinin yetersiz olmasının kuluçkahane boyunca tanktan tanka horizontal bulaşmada çok büyük bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (Toffan ve ark., 2017).

Ölü, bütünlüğü bozulmuş balıklar farklı biyolojik vektörlere ulaşarak çevreye virus yayabilmektedirler. Daha ileri olarak hastalıklı balıklar, enfekte olma olasılığı da bulunan predatör (avcı-yırtıcı) balıklar tarafından yenerek bu balıkların enfekte gaitalarıyla etrafa bulaşmaktadır. Hastalığın olası diğer bir bulaşması anaçların ham balıklarla beslenmesidir (Mori ve ark., 2005).

Sudaki tuz oranı sınırlayıcı bir faktör gibi görünmemesine rağmen, çoğu VNN salgını marin akuakültür alanlarında ortaya çıkmıştır (Bovo ve ark., 2011).

1.3.1.2. Vertikal Bulaşma

Vertikal bulaşmaya bazı türler yüksek derecede duyarlıdır. Çizgili levrek, levrek, barramundi, pisi balığı, atlantik halibut, ve lahos türü balıklarda anaçlardan yavrulara vertikal bulaşmanın olduğuna dair kanıtlar vardır. Bu durumdaki anaçlar larva ve juvenil balıklar için en önemli enfeksiyon kaynaklarıdır (Arimoto ve ark., 1992; Comps ve ark., 1994; Grotmol ve Totland, 2000; Mori ve ark., 1998; Mushiake ve ark., 1994; Watanabe ve ark., 2000). Bu gerçek özellikle klinik hastalığın erken evrede görülmesi ve olgun gonadlardan viral genetik materyalin

tespiti ile gösterilmiştir (Dalla Valle ve ark., 2000; Mushiake ve ark., 1994; Nishizawa ve ark., 1996). Ayrıca gonadlara ulaşma durumunda yumurta ve seminal sıvılar enfekte olmaktadır (Nishizawa ve ark., 1994). Çipuralarda vertikal bulaşma, yumurtadan çıkıştan 10-15 gün sonra larvalarda doğrulanmıştır. Mao ve ark. (2015), tarafından Çin’de pasifik codlarda (*Gadus macrocephalus*) larval döneminde % 90 mortalitenin görüldüğü bir salgında BFNNV tespit edilmesinden sonra yapılan geri izleme çalışmasında da gonad, yumurta, döllenmiş yumurta ve fry boy balıkların hepsinde aynı virusun tespit edilmesi salgında vertikal bulaşmanın önemli olduğunu göstermiştir.

Virusun vertikal bulaşma özelliği genellikle küçük boy balıklarda hastalık riskini artırmaktadır (Costa ve Thompson, 2016). Balık larvalarında VNN salgınları, hastalığın vertikal olarak bulaştığını ve virusun yumurtalık, sperm, döllenmiş yumurta ve yumurtadan yeni çıkmış larvalarda bulunduğunu düşündürmektedir. Sperm içindeki virusun varlığı, dölleme sonrası yumurtaların enfeksiyonu ile birlikte gösterilmiştir (Arimoto ve ark., 1992; Breuil ve ark., 2002).

Virusun anaçların gonadlarında ve diğer birçok organda (karaciğer, böbrek, mide ve bağırsak) üreme stresi sırasındaki virus replikasyonu ile taşındığına inanılmaktadır. Avrupa deniz levreği ve çipuraların testislerinde virus replikasyonu ve kolonizasyonu açık bir şekilde gösterilmiştir. Yumurtlama sırasında anaçların gonadları ve sindirim kanalından saçılan virus, yumurta, sperm ve larvaları enfekte eder (Valero ve ark., 2015a).

1.3.2. Konakçı Dağılımı

Betanodavirusların, 11 farklı diziye ait 30 farklı aileden 120’den fazla, farklı çiftlik ve yabani balık ve omurgasız türü üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (Costa ve Thompson, 2016). Balık nodaviruslarının küresel boyutta yaygınlığı vardır ve çok sayıda farklı balık türüne bulaşabilmektedir (Shetty ve ark., 2012).

En çok çizgili levrek, levrek, grouper (lahos-hani-orfoz) ve yassı balıklarda (flatfish) görülmekle birlikte, başlıca deniz balıklarını etkilemektedir (Munday ve ark., 2002; Sano ve ark., 2011). VNN virusunun ilk tespit edildiği yıllarda dünyanın farklı coğrafyalarında başlıca; japon papağan balığı (*Oplegnathus fasciatus*) (Yoshikoshi ve Inoue, 1990), asya levreği (*Lates calcarifer*) (Glazebrook ve ark., 1990; Renault ve ark., 1991; Munday ve ark., 1992), levrek (*Dicentrarchus labrax*) (Breuil ve ark., 1991), kalkan (*Scophthalmus maximus*) (Bloch ve ark., 1991), redspotted grouper (*Epinephelus akaara*) (Mori ve ark., 1991) ve striped jack (*Pseudosciaenops dentatus*) (Mori ve ark., 1992) türü balıklarda görülmüştür. Betanodaviruslar için, Striped jack, Avrupa deniz levreği, barfin flounder (*Verasper moseri*), seven-band grouper ve Atlantic halibut, broodfish gibi türler en uygun ve kalıcı virus rezervuarları olup, larva ve juvenil balıklar için en önemli enfeksiyon kaynaklarıdır (Mushiake ve ark., 1994; Watanabe ve ark., 2000).

Çipuralarda betanodavirus ile ilgili salgınlar bildirilmiştir (Bitchava ve ark., 2007; Comps ve Raymond 1996). Sağlıklı görünen veya sporadik olarak etkilenmiş çipura larva ve postlarvalardan VNN virusunun izole edilmesine rağmen, çipuraların genel olarak VNN virusuna dirençli oldukları düşünülmüştür. Levreklerdeki VNN salgınlarının pek çoğu RGNNV suşu ile ilişkilendirilmiş ve bu virus türüne çipuraların duyarlı olmadıkları benimsenmiştir (Toffan ve ark., 2017). Nitekim RGNNV ile muamele edilen çipuralarda yalnızca intramusküler yolla deneysel enfekte edilenlerde ölümler görülmüş, daha yaşlı balıklarda ise testlerle betanodavirus pozitif bulunmalarına rağmen hafif veya hiçbir klinik bulgu görülmemiştir (Castric ve ark., 2001; Valero ve ark., 2015a). Bu nedenle çipuraların levrekler için hep asemptomatik taşıyıcı oldukları öne sürülmüştür. Geçtiğimiz yıllarda çipuralarda betanodavirus ile ilişkili yalnızca birkaç sporadik ölüm olayı bildirilmiştir ki bu nedenle çipuraların VNN patogenezi ve epidemiyolojisindeki rolü üzerindeki bilgiler sınırlı kalmıştır (Toffan ve ark., 2017).

Tatlı su balığı çiftliklerinde çok az salgın rapor edilmiştir (Bovo ve ark., 2011; Chi ve ark., 2003). Bazı tatlı su süs balığı türlerinde deneysel olarak klinik belirtiler oluşturulmuştur (Furusawa ve ark., 2007). Betanodavirus ayrıca akvaryum

balıklarından, çift kabuklu yumuşakçalardan, karideslerden ve kabuklulardan da izole edilmiştir (Gomez ve ark., 2006).

VNN salgınları, mersin balığı (*Acipenser gueldenstaedtii*) (Athanasopoulou ve ark., 2004; Xylouri ve ark., 2007), tilapia (tatlı su çipurası-*Oreochromis niloticus*) (Bigarré ve ark., 2009), geniş ağızlı levrek (*Micropterus salmoides*), sudak balığı (*Sander lucioperca*), çizgili levrek, beyaz levrek (*Morone saxatilis*) (Bovo ve ark., 2011), lepistes (*Poecilia reticulata*) (Hegde ve ark., 2003), Avustralya kedi balığı (*Tandanus tandanus*), morina balığı (*Oxyeleotris lineolatus*) (Munday ve ark., 2002), horozbina (*Salaria fluviatilia*) (Vendramin ve ark., 2012) gibi pek çok tatlı su balığı türünde de bildirilmiştir.

Betanodavirusun hem tatlısu hem deniz suyuna yüksek dayanıklılığı, çevreye yüksek direnci ve dünya çapındaki dağılımından dolayı, yaban hayatı balıklarıyla yapılan araştırmalarda bu hastalığın her zaman dikkate alınmasını gerekli kılmaktadır (Vendramin ve ark., 2012).

1.3.3. Konakçı Duyarlılık Dönemleri

Hastalığın ilk defa bildirildiği yerlerdeki yaşlarda ve mortalitelerin görüldüğü periyotlarda dikkate değer bir varyasyon bulunmaktadır (Munday ve ark., 2002). Özellikle larva ve juvenil boy balıklar VNN virusuna duyarlıdır, salgın durumlarında bu boy balıklarda %100'e varan mortaliteler meydana gelmektedir (Costa ve Thompson, 2016). Genelde hastalığın erken belirtileri ortaya çıktığında mortalitede büyük bir oran vardır. Çizgili levreklerde larvaların hemen hemen tümünün kaydebilmesiyle sonuçlanan hastalığın en erken görülmesi yumurtlamadan 2 gün sonra iken, mortaliteler yumurtlamadan sonraki 10 gün içinde en yüksek sıklıkta görülmektedir. Levreklerde yumurtlamadan sonraki 30 güne kadar genellikle ölüm gözlenmez, ancak salgınlar pazarlama büyüklüğünde de görülebilir. Mortalite yaşa bağımlıdır (Anonim, 2017a).

VNN virusunun ilk tespit edildiği yıllarda striped jack türü balıklar üzerinde yapılan patojenite çalışmalarında larvaların (3,5-4,4 mm) virusa duyarlı olduğu ve enfeksiyonu oluşturduğu, juvenil boyların (78 mm) ise virusa duyarlı olmadığı ve enfeksiyon oluşturmadığı ortaya konulmuştur (Arimoto ve ark., 1993b). Ancak bu çalışmanın çıktısı bütün balık türleri için genellenmemelidir. Bildirilen farklı çalışmalarda daha farklı balık türlerinde hem larva hem pazar boylarında hastalık tespit edilmiştir. Hastalığın başlıca larva ve juvenil formdaki balıkları etkilemesine rağmen, Atlantik halibut, seven-band grouper (lahoz-*Epinephelus septemfasciatus*) ve levrek gibi balıkların yetişkin ve market büyüklüğünde olanlarında da rapor edilmiştir (Anonim, 2017a).

Enfekte çiftliklerde etkenin tespit ihtimali normal olarak juvenillerde olgunlardan daha fazladır. Yumurtlama döneminde virus, anaçların gonadlarında da bulunabilir (Dalla Valle ve ark., 2000; Mushiake ve ark., 1994). Bu nedenle surveylans programlarına genç balıkların yanında gonad dokuları, ovaryum sıvıları ve spermelerin de dahil edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Anonim, 2017a).

Epidemiyolojik açıdan bakıldığında, hastalığı atlatan çipuralarda virusun aylar sonra bile hem rt RT-PCR hem de virus izolasyonu yoluyla pozitif bulunması son derece önemlidir. Virus stresli koşullar altında (transport, kötü yönetim vb.) yeniden etkinleşebilir veya alternatif olarak duyarlı balıklara aktarılabilir. Her durumda, noda-free durumun laboratuvar teyidinin olmadan çok sağlıklı görünen çipuraların bir çiftliğe girişi ciddi bir tehdit oluşturabilir (Toffan ve ark., 2017).

1.3.4. Hastalığın Coğrafi Dağılımı

1.3.4.1. Hastalığın Dünyadaki Durumu

Betanodaviruslar deniz kültür balıkçılığı için büyük bir kısıt olarak ortaya çıkmış ve dünya çapında ciddi kayıplara neden olmuştur. Yaygın bir coğrafi dağılım ve geniş bir konakçı spektrumu gösterirler (Nuñez-Ortiz ve ark., 2016).

Betanodavirusların, farklı sıcaklıklara adaptasyonunun bir sonucu olarak, belirli konakçı aralığı ile ilişkili belirli coğrafi dağılımlara sahip oldukları bildirilmiştir. Çevresel koşullar ile viral clusterler arasında bir korelasyon vardır (Chérif ve ark., 2009).

Hastalık ilk çıktığı 1985'ten bu yana, Güney Amerika hariç dünyanın pek çok bölgesinde bildirilmiştir (Costa ve Thompson, 2016). Güney ve Doğu Asya (Çin, Hindistan, Endonezya, İran, Japonya, Kore, Malezya, Filipinler, Tayland, Vietnam), Okyanusya (Avustralya, Tahiti), Akdeniz (Fransa, Yunanistan, İsrail, İtalya, Malta, Portekiz, İspanya, Tunus), Birleşik Krallık, Norveç, Karayip ve Kuzey Amerika (Kanada, ABD)'da bildirimler bulunmaktadır (Munday ve ark., 2002). Ayrıca Senegal ve Libya sahillerinde yabancı lahoslarda betanodaviruslardan şüphelenilen mortaliteler resmi olmayan yollarla bildirilmiştir (Anonim, 2017a).

Konak-sıcaklık bağımlılığı, farklı kümelerin (cluster) coğrafi dağılımını yansıtır. BFNNV grubunun tümü Kuzey Amerika Atlantik sularında, Norveç, İskoçya, Fransa Atlantik kıyıları ve Japonya'da bulunan soğuk su balıklarından (Atlantik halibut, Pasifik morina (*Gadus microcephalus*), Atlantik morina balığı, Avrupa levreği, Dover sole (*Solea solea*) ve Barfin folunder) izole edilen soğuk su betanodaviruslarıdır (Grotmol ve ark., 2000; Starkey ve ark., 2000; Starkey ve ark., 2001).

RGNNV, en geniş coğrafi dağılımı olan kümedir ve tüm Akdeniz havzası, ABD, Fransız Polinezyası, Asya ve Avustralya'da bulunur (Chérif ve ark., 2010; Curtis ve ark., 2001; David ve ark., 2010; Moody ve ark., 2009; Sakamoto ve ark., 2008; Skliris ve ark., 2001; Panzarin ve ark., 2012; Toffolo ve ark., 2007).

SJNNV genotipi, 2007 yılında İber Yarımadasında izole edilene kadar coğrafi olarak Japonya suları ile sınırlıyken (Cutrin ve ark., 2007), aynı yıl içerisinde Adriyatik Denizi'nde (Hırvatistan ve İtalya) Avrupa deniz levreğinden izole edilen reassortant betanodavirus (SJNNV/RGNNV) izolatları ilk defa tanımlanmıştır (Toffolo ve ark., 2007). Bunun çapraz reassortantı olan RGNNV/SJNNV genotipi ise

günümüzde Güney Avrupa ve İber Yarımadasında levrek, çipura ve dil balıklarında yaygın olarak bulunmaktadır (Olveira ve ark., 2009; Panzarin ve ark., 2012).

VNN, Akdeniz havzasında endemiktir ve hastalığın ortaya çıkışı hem çiftlik hem de vahşi balıklarda çok kez ortaya konulmuştur (Toffan ve ark., 2017). Betanodaviruslar, Akdeniz’de kültür balıkçılığında bildirilen en önemli viral patojendir (Athanassopoulou ve ark., 2003) RGNNV, bu bölgede en çok tespit edilen virus türüdür (Costa ve Thompson, 2016), ancak SJNNV türü de 2009 yılında İber Yarımadasında bildirilmiştir (Panzarin ve ark., 2012). Reassortant RGNNV/SJNNV ve SJNNV/RGNNV suşları sadece Akdeniz’de bildirilmiştir (He ve Teng, 2015).

1.3.4.2. Hastalığın Türkiye’deki Durumu

Ülkemizde VNN hastalığı ile ilgili olarak ilk çalışma Özkan Özyer ve ark. (2012), tarafından yapılmıştır. Çalışma kapsamında Ege Bölgesinde yer alan 20 kuluçkahane ve 33 yetiştirme işletmesinden iki yıl süreyle sağlanan levrek ve çipura örnekleri araştırılmış ve VNN virusu tespit edilmemiştir. Özkan Özyer ve ark. (2014), tarafından ülkemizde levreklerden ilk izolasyon 2011 yılında Mersin ilinde tespit edilmiştir. Virusun identifikasyonu striped snakehead fish fry (SSN-1) hücre kültüründe virus izolasyonunu takiben immunfloresan antikor testi (IFAT) ve reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) tekniği ile yapılmıştır.

Balık Hastalıkları Ulusal Referans Laboratuvarı olan İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Viroloji Bölümü tarafından ülkemizdeki kuluçkahane ve işletmeler düzenli olarak taranmaktadır. Taramalar kapsamında, 2012 ve 2014 yıllarında kuluçkahanelerden herhangi bir klinik bulgu göstermeyen, sağlıklı görünümdeki yavru levrek ve çipuralardan virus tespit edilmiştir. Bu kuluçkahaneden yavru levrek alan bir yetiştirme tesisinde yüzme bozukluğu ve sinirsel bulgular göstererek günlük % 10 civarında ölüm bildirilerek teşhis için getirilen yavru levreklerden de virus izolasyonu yapılmıştır. 2014 yılında yine ayrı bir kuluçkahaneden yüzme bozukluğu

ve sinirsel bulgular göstererek günlük % 5 civarında ölüm bildirilerek teşhis için getirilen yavru levreklerden de virus izole edilmiştir (Kalaycı ve ark., 2016).

1.3.5. Prevalans

Hastalığın prevalansı üzerine olan veriler oldukça azdır. Kanada’da yabani türlerin belirli populasyonlarının hastalığın doğal rezervuarı olarak rol oynayabilecekleri ile ilgili şüpheler vardır (Anonim, 2017a). Barker ve ark. (2002), tarafından Amerikan pisi balığı (*Pleuronectes americanus*) türü balıklarda PCR ile 440 balıktan sadece 1 adedinde pozitiflik bulunmuş ve % 0,23 prevalans bildirilmiştir. Japonya’da iki farklı koydan toplanan 30 farklı türe ait 131 adet sağlıklı görünümdeki çiftlik ve yabani tür balıklarda, RT-PCR ile 30 adet (% 22,9); Nested RT-PCR ile ise 116 adetinde (% 88,5) pozitiflik saptanmıştır (Gomez ve ark., 2004). Yine Japonya’da 20 türe ait 729 adet yabani tür balıkta yapılan prevalans çalışmasında, RT-PCR ile 6 adet (% 0,82); Nested RT-PCR ile ise 87 adetinde (% 11,9) pozitiflik saptanmıştır (Sakamoto ve ark., 2008).

Liu ve ark. (2015), tarafından VNN virusunun Çin’de yaygınlığının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada; yaban hayatında 59 türe ait 892, kültürü yapılan 11 türe ait 381 balıkta sırasıyla % 42,3 ve % 63 pozitiflik tespit edilmiştir. Çalışma yapılan bölgenin su ısısının 20-30 °C arasında olduğunun bildirildiği çalışmada, filogenetik araştırmada tüm izolatlar su ısına uyumlu olarak RGNNV genotipinde tespit edilmiştir (Liu ve ark., 2015).

Berzak ve ark. (2019), tarafından Akdeniz’de İsrail kıyılarında toplanan 195 yabani balık türü ve 33 adet kum yengecinde betanodavirus varlığı araştırılmış ve virus balıkların 47’sinde, kum yengeçlerinin ise 2’sinde tespit edilmiştir. Buna göre toplam prevalans % 21,49 olarak tespit edilmiştir.

1.4. Patogenez

Betanodavirusların yaşam döngüsü hakkındaki bilgiler azdır. Farklı uzmanlar tarafından gerçekleştirilen deneysel enfeksiyonların sonuçları düşünüldüğünde, virus konakçıyı büyük ihtimalle intestinal epitelyum ve perifer sinir sistemi aracılığıyla istila etmektedir. Konakçının ölümüne veya uzun yıllar persiste kalabilmesine sebep olan merkezi sinir sistemine çok kısa sürede ulaşır (Johansen ve ark., 2004). Betanodavirus patojenitesi, hem çevresel koşullar hem de konakçı türler tarafından etkilenir (Souto ve ark., 2015c; Vendramin ve ark., 2014). Patolojiye neden olmak için dokuda belirli bir miktarda virus partikülü bulunması gerekir (Korsnes ve ark., 2009). Betanodavirus'un nörotropik bir etken olarak nöronal dokularında patolojiye neden olduğu ve nöronal olmayan dokularda patolojiye neden olmadığı bildirilmiştir (Mori ve ark., 1991; Yoshikoshi ve Inoue, 1990).

Betanodavirus için tek bir enfeksiyon yolunun olmadığı düşünülmektedir. Japon papağan balıklarında (*Oplegnathus fasciatus*) omurilik ve omurilik gangliyonları lezyonlarının ilk bölgeleri iken; asya levreğinde beyincik, optik tectum ve retina enfeksiyon lezyonların ilk bölgeleridir (Renault ve ark., 1991; Yoshikoshi ve Inoue, 1990). Stripe Jack'lerde, sinir hücrelerinin nekrozu ve vakuolizasyonu ilk olarak spinal kortda, özellikle hava kesesini çevreleyen bölgede gözlenir ve bu alanın virus replikasyonunun başlangıç yeri olduğu düşünülmektedir (Nguyen ve ark., 1996). Bazı araştırmacılar, virusun omuriliğin tabanında anterior yönde yayıldığını, beyne ilerlediğini ve retinada sonlandığını ileri sürmektedir. Bu durum enfeksiyonun geç evresinde meydana gelen beyin ve retina lezyonlarını açıklamaktadır (Costa ve Thompson, 2016). Atlantik halibut ile yapılan bir çalışmada, lezyonların başlangıç odağının, beyin sapının kaudal kısmı ve anterior bağırsağın tabakalı epiteli olduğu gösterilmiştir (Húsgarð ve ark., 1999). Enfeksiyonun MSS'nde beyin sapına yayılması, vagus siniri de dahil olmak üzere kranial sinirlerin aksonları aracılığıyla olduğu bildirilmektedir (Costa ve Thompson, 2016).

Konağın enfeksiyonunun burun boşluğu aracılığıyla olabileceği de ileri sürülmüştür. Araştırmacılar, virusun nazal epitele penetre olduğunu, olfaktor sinir ve

bulbus olfactorius aracılığıyla yayıldığına, beynin orta dokusuna, medulla oblongata, omuriliğe ve son olarak retinaya doğru gittiğini öne sürmektedirler (Mladineo, 2003; Tanaka ve ark., 2004).

Moleküler çalışmalar ile, betanodavirus enfeksiyonunun dinamiklerinin ne kadar hızlı olduğunu ortaya konulmuştur; intraperitoneal (ip) enjeksiyon sonrası 4 saat içinde beyin, böbrek, dalak, solungaç, kalp ve kas dokusunda virus tespit edilmiş ve kantitasyonu yapılmıştır (Su ve ark., 2015).

Virusun aktif olarak replikasyonu sonucunda geniş doku vakuolizasyonları oluşturduğu beyin, spinal kord ve retina hedef organ olarak düşünülmektedir. Levrek, barramundi (*Lates calcarifer*), Japanese parrotfish (Japon papağan balığı-*Oplegnathus fasciatus*) ve brown-spotted grouper (orfoz-*Epinephelus malabaricus*)'ların beyin hücrelerinde intrasitoplazmik inklüzyonlar tanımlanmıştır (Munday ve ark., 2002). Virus ayrıca anaçların gonadlarında da tespit edilmiştir (Dalla Valle ve ark., 2000; Mushiake ve ark., 1994; Nishizawa ve ark., 1996). Virusun reproduktif organlarda her zaman replike olamayabileceği ve normal şartlarda bulunmayacağı, büyük ihtimalle stres koşullarında dokuda bulunduğu ileri sürülmüştür (Mushiake ve ark., 1994).

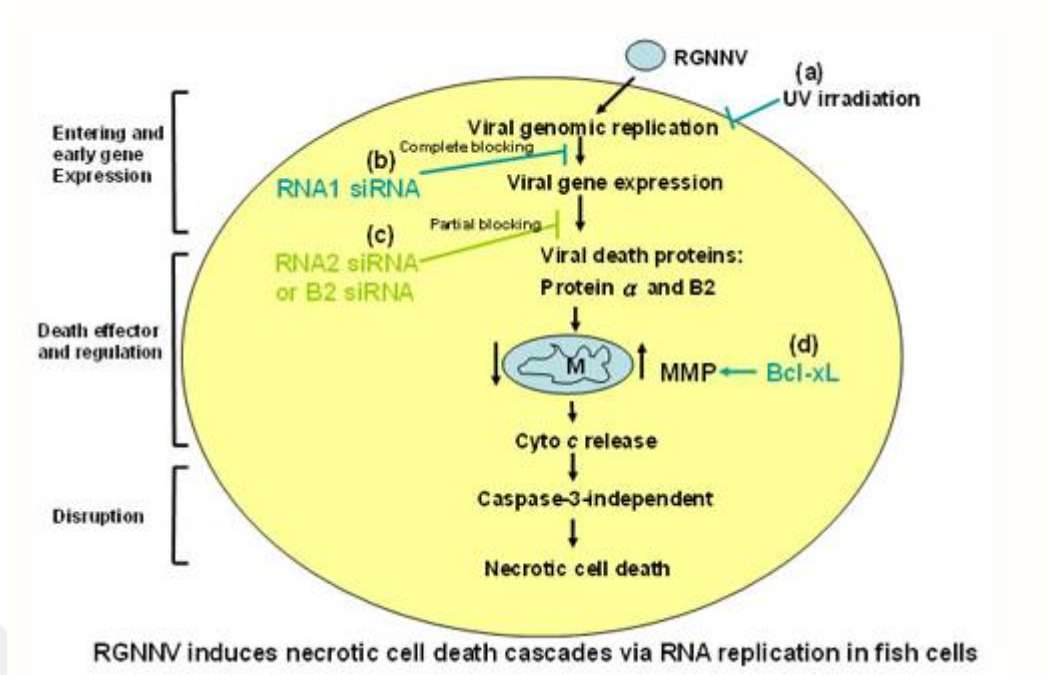
Yırtıcı balıklarda (*Anarhichas minor*) daldırma ile oluşturulan deneysel enfeksiyonda, maruziyeti takiben 16 haftaya kadar beyinde virus tespit edilmiştir (Johansen ve ark., 2003). Atlantik halibut'larda doğal enfeksiyon sonrası canlı kalanlarda hastalığın gelişimi bir yıl boyunca gözlemlenmiştir (Johansen ve ark., 2002); PCR ve ELISA ile pozitif tespit edilenlerin oranı tüm periyot boyunca yüksek kalmıştır ve subklinik enfekte balıklardan bir yılın sonunda virus tekrar izole edilmiştir.

1.4.1. İmmun Yanıttan Kaçınma Mekanizması

Grouper'lerdeki akut NNV enfeksiyonlarının, virusun immün sistemden kaçınma stratejilerine bağlı olarak persiste enfeksiyon ile sonuçlanabileceği bildirilmiştir (Chen ve ark., 2014). Virus, konakçının hem doğal hem de hücreSEL immün yanıttan kaçınmasını sağlayan mekanizmalar geliştirmiştir. Betanodaviruslar için immün yanıttan kaçınma mekanizmalarından temel olarak bilineni, B2 proteininin konakçı RNA interferansını antagonize etme kabiliyetidir (Fenner ve ark., 2006b). B2, uzun viral dsRNA'ya bağlanarak, betanodavirusa karşı konağın immün yanıtı tarafından RNA-susturmayı uyaran siRNA'nın üretiminden korur (Fenner ve ark., 2006a; Fenner ve ark., 2007). Bu durum, enfekte dokularda viral proteinlerin birikmesini kolaylaştırır (Costa ve Thompson, 2016).

Apoptozis, konakçı immün savunma mekanizmalarından biridir, ancak virus immün yanıttan kaçınma mekanizması olarak konakçı hücrelerin apoptosise maruz kalmasına da neden olabilir (Finlay ve Mcfadden, 2006). Apoptozis indüksiyonu üç yoldan oluşur; 1-ölüm reseptörü veya ekstrinsik yol (kaspaz-8 tarafından aktive edilir), 2-mitokondriyal veya intrinsik yol (kaspaz-9 ile aktive edilir) ve 3-ER (endoplazmik retikulum) stres aracılı yol (kaspaz-8 tarafından aktive edilir) (Su ve Hong, 2010). İlk çalışmalar, protein- α 'nın, kaspaz bağımlı apoptozisi (kaspaz-3-benzeri ve kaspaz-8-benzeri) indüklediğini göstermiştir (Guo ve ark., 2003b).

Betanodavirusların konakçı hücrelerde, fosfatidilserin (PS) eksternalizasyonu (erken apoptotik evre), DNA'nın parçalanması ve kaybına neden olan mitokondriyal permeabilite geçiş gözenğine (MPTP) müdahale edilmesi sonucunda mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) ve sitokrom-C (orta apoptotik evre) salınımına neden olarak, apoptotik nekroz hücre ölümünü indükleyebileceği gösterilmiştir (Şekil 1.10) (Chen ve ark., 2006; Guo ve ark., 2003b; Wu ve ark., 2008a; Wu ve ark., 2010b). Post-apoptotik nekroz, protein- α tarafından aktive edilen kaspaz 3 ve 8 tarafından başlatılır (Wu ve ark., 2008a). Sitokromun-C'nin serbest bırakılmasından ayrı olarak, bu apoptosis işlemi, B2 proteininin sentezine sebep olur (Chen ve ark., 2007).



Şekil 1.10. RGNNV'nin Nekrotik Hücre Ölümünü İndüklemesi (Wu ve ark., 2010b).

Betanodavirus proteinleri ve konakçı hücre ölümü ile sonuçlanan konakçının mitokondri arasındaki etkileşimin önemi iyi bilinmektedir. B2 proteini, mitokondriyal matriks ile küçük kompleksler oluşturarak mitokondriye hedeflenir ve bağlanarak nekrotik hücre ölümünü de indükler. İndükleme, kompleks II'nin aktivitesinin inhibe edilmesi ve mitokondriyal ATP'yi yok sayılmasıyla olur (Su ve Hong, 2010). Protein α ve B2 proteininin aktivitesinin yanı sıra, B1 proteininin de enfeksiyonun erken evresinde eksprese edildiği ve mitokondri ile etkileşime girdiği, erken apoptotik PS eksternalizasyonunu ve MMP kaybını azalttığı ve bunun da viral replikasyon için mevcut konakçı hücrelerin miktarında artışa neden olduğu ileri sürülmüştür (Chen ve ark., 2009). Betanodavirus ve ER stres aracılı yol arasındaki etkileşim, viral replikasyonun orta evresi sırasında chaperone proteini GRP78'in (glikoz regüle edilmiş protein) yukarı regülasyonu ile gösterilmiştir. Mitokondriyumda, betanodavirus RdRp ile etkileşime girer ve viral replikasyonu arttırmaya yardımcı olur. Ayrıca ER ilişkili kaspaz 12 aktive olur (Su ve ark., 2011). Betanodavirus tarafından indüklenen oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) varlığıyla enfekte kalkan beyinde gözlemlenmiştir (Montes ve ark., 2010) ve GF-1 hücrelerinde ROS varlığı enfeksiyonun erken safhasında (enfeksiyondan 24 saat

sonra) gözlenmiştir. Mitokondriyal morfolojiyi etkileyerek ve MMP kaybına neden olarak hücre ölümünü indükler (Chang ve ark., 2011). B2 proteinin mitokondriyi hedefleyerek ve H₂O₂ üretimini indüklediği ve bu sayede oksidatif stresi başlattığı düşünülmektedir; H₂O₂ daha sonra, hücre ölümü ve parçalanmasına neden olan mitokondri ile ilişkilendirilen dinamin ilişkili proteini (Drp1) aktive eder (Su ve ark., 2014).

1.4.2. Konakçı İmmun Yanıt Mekanizması

Zebra balığı hücre hattı kullanılarak yapılan bir in vitro çalışmada, betanodavirus enfeksiyonunda RLR (retinoic acid-inducible gene I (RIG-1)-like receptors-retinoik asit indükleyen gen-1 benzeri reseptör)'lerin ve MyD88 (Myeloid Differentiation Primary Response 88-miyeloid diferansiyasyon faktör 88)'e bağlı TLR (Toll-like receptors - çan benzeri reseptör)'lerin ortaya çıktığı iki PPR grubunun yukarı regüle edildiğinin gösterilmesiyle ortaya konulmuştur. Ayrıca, betanodavirus enfeksiyonu sırasında RIG-I'in grup II tip I IFN'nin düzenlenmesi ve enflamatuvar yanıtta önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. RIG-I, grup II tip I IFN üretimini ve monositlerin göçünü baskıladığı gösterilmiştir (Chen ve ark., 2015b). Bir başka in vivo çalışmada Deniz levreği (*Lateolabrax japonicus*) kullanılarak yapılan RGNNV deneysel enfeksiyondan sonra, beyin, dalak ve böbreklerde MAV (mitokondriyal antiviral sinyal) ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Jia ve ark., 2016). Viral ssRNA'yı tanıyan TLR7'nin, betanodavirus ile enfekte olmuş Atlantik halibut'ta daha yüksek ekspresyon seviyelerine sahip olduğu da gösterilmiştir (Øvergård ve ark., 2012).

Betanodavirus ile enfekte balıklarda tip I ve II IFN tespit edilmiştir. Betanodavirus ile enfekte Atlantik halibut'ta yüksek düzeyde IFN γ ekspresyonu saptanırken, enfekte kalkanlarda IRF1 (interferon regulatory factor 1- interferon düzenleyici faktör-1) indükleyici IFN γ 'nın yukarı regülasyonu ortaya konulmuştur (Montes ve ark., 2010; Øvergård ve ark., 2012).

Grup 1 tip 1 IFN indükleyici antiviral bağışıklık molekülü olan Mx proteininin, betanodavirus enfeksiyonu ile mücadelede önemli bir rol oynadığı grouper ve barramundi hücre hatları ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Mx proteini RdRp ile etkileşerek, RdRp proteininin perinükleer alana yeniden dağılımını sağlar ve degradasyona sebep olarak viral proliferasyonu azaltır (Chen ve ark., 2008; Lin ve ark., 2006; Wu ve Chi, 2007; Wu ve ark., 2010a). Mx proteinlerinin salınımında genotipler arasında farklılıklar bulunmaktadır. Avrupa levreğinde yapılan bir çalışmada, SJNNV genotipi Mx salınımının, RGNNV genotipinden oldukça fazla olduğu ortaya konulmuştur ki, bu durum Avrupa levreğinin neden RGNNV genotipine karşı daha duyarlı bir tür olduğunu açıklayabilmektedir (Carballo ve ark., 2016).

Atlantik halibut, levrek ve kalkanlarda nervöz nekroz virus enfeksiyonunda, IL-1 β , IL-6 and TNF α (Tümör Nekroz Faktör) gibi yangı öncesi sitokinlerin yukarı regülasyonu gösterilmiştir (Dios ve ark., 2007; Øvergård ve ark., 2012; Poisa-Beiro ve ark., 2008; Scapigliati ve ark., 2010). Avrupa levreğinin beyinde, çipuralardan çok daha fazla miktarda tespit edilen TNF α 'nın, Avrupa levreği enfeksiyonunda ortaya çıkan nöroinflamasyon ve vakuolizasyondan sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür (Poisa-Beiro ve ark., 2008).

Betanodavirus enfeksiyonu sırasında üretilen IgM sınıfı antikorlar, RGNNV ve SJNNV'nin kapsid proteininin spesifik bölgelerini hedef alarak üretilir ve bu bölgeler N terminali ile C terminali üzerindedir ve 91-162, 180-212 ve 254-256 amino asitleri tarafından oluşturulan bölgeler üzerinde tanımlanmıştır (Chen ve ark., 2015a; Coeurdacier ve ark., 2003; Costa ve ark., 2007; Nishizawa ve ark., 1999). Betanodavirus ile enfekte Atlantik halibut, Avrupa levreği ve çipuralarda T-hücre markır (TRC β , CD4-2, CD4, CD8 α , CB8 β , Lck, NCCRP-1 ve ZAP-70) ekspresyonlarında da artış gözlemlenmiştir (Chaves-pozo ve ark., 2012; Øvergård ve ark., 2012; Scapigliati ve ark., 2010).

VNNV'nin hedef dokusu immünolojik olarak ayrıcalıklı bir bölge olan MSS'dir. Gonadlar, immun yanıtın, germ hücresi hasarını önlemek için sıkı bir

şekilde düzenlendiği immunolojik olarak ayrıcalıklı bir başka bölgedir (Valero ve ark., 2013). Bir çalışmada, antimikrobiyal peptitlerin (AMP) rolü, Avrupa levreği ve çipuralarının gonadlarında AMP genlerinin (kompleman faktörü 3, lizozim, hepsidin, disentrasin, piscidin veya b-defensin) ekspresyonu incelenmiştir. AMP, her iki türün gonadlarında da tespit edilmiş, ancak duyarlı Avrupa levreklerinde daha aktif oldukları tespit edilmiştir. Bu durumun iki türün virusa karşı duyarlılıklarında farklılıkları olduğu sonucuna varılmıştır (Valero ve ark., 2015a). Aynı araştırmacılar, VNNV enfeksiyonundan sonra aynı tür balıkların gonadlarında ve beynindeki IFN üretiminde rol alan genlerin ekspresyon profillerini incelemişlerdir ve Avrupa levreğinin beynindeki doğal bağışıklığın virusu temizleyemediği sonucuna varmışlardır. Virusun vertikal bulaşmasını kontrol etmek için gonad bağışıklığının da önemli olduğu bildirilmektedir (Valero ve ark., 2015c).

Betanodavirus enfeksiyonunu atlatan balıkların doğal re-enfeksiyona karşı direncinin açıklandığı kabul edilen nötralizan antikor oluşturduğu gösterilmiştir (Tanaka ve ark., 2001).

1.5. Klinik Belirtiler

Klinik belirtiler ile su sıcaklığı arasında kuvvetli bir korelasyon vardır ve bu durum özellikle levreklerde iyi bir şekilde bilinmektedir, bu nedenle hastalık ilk başlarda yaz hastalığı olarak isimlendirilmiştir (Anonim, 2017a). Klinik belirtilerin görülmesiyle su sıcaklığı arasındaki ilişki başlıca in vitro çalışmalarla desteklenmiştir (Iwamoto ve ark., 2000). Su sıcaklığının konakçı spesifitesi ise RGNNV genotipi ılık su balıklarında, BFNNV ise soğuk su balıklarında görülmektedir. SJNNV genotipi (in vitro optimum gelişme sıcaklığı: 20-25 °C) tarafından enfekte edilen çizgili levrek larvalarında, 20-26°C arasındaki farklı sıcaklıklarda beslenen farklı gruplar arasındaki mortalitelerde farklılık bulunmazken, RGNNV genotipi (in vitro optimum gelişme sıcaklığı: 25-30°C) ile enfekte olanlarda 16-28°C arasındaki farklı sıcaklıklarda beslenen farklı gruplarda hastalığın gelişimi etkilenebilmektedir (Arimoto ve ark., 1993a). Kambur grouper'lerde (*Chromileptes altivelis*)

RGNNV'nin proliferasyonu 31 °C'den daha fazla sıcaklıkta inhibe olurken (Yuasa ve ark., 2007), hastalığın daha yüksek mortalitesi ve daha erken klinik belirtileri daha yüksek sıcaklıklarda da (35 °C) gözlenmiştir (Hata ve ark., 2007; Tanaka ve ark., 1998). Diğer taraftan Atlantik halibut'larda AHNV'nin enfeksiyonu (BFNNV genotip, optimum gelişme sıcaklığı: 15-20 °C) 6 °C'de ortaya çıkmaktadır. Benzer şekilde levreklerde VNN salgınlarının 15°C'de de ortaya çıktığı bildirilmiştir (Borghesan ve ark., 2003). Hastalığın tatlı su balıklarında da bildirilmesinden dolayı tuzluluk oranının hastalığın ortaya çıkmasına herhangi bir etkisinin olmadığı düşünülmektedir (Anonim, 2017a).

Klinik belirtiler balık türlerine göre farklılık göstermekle birlikte, genellikle deride anormal renk değişikliği (solgunluk veya koyulaşma), anoreksi, letarji, su yüzeyinden aşağı doğru yüzme, dipte dinlenme, davranışlarda durgunluk gözlenir. Ayrıca, dönme, aniden dönme, yatay dönme, dibe batma, ani veya tirbuşon tarzında yüzme gibi yüzme hareketlerinde değişiklikler ve hava kesesi yangısı gözlenmektedir (Arimoto ve ark., 1993a; Bloch ve ark., 1991; Fukuda ve ark., 1996; Glazebrook ve ark., 1990; Grotmol ve ark., 1997; Mori ve ark., 1991; Munday ve Nakai, 1997; Munday ve ark., 2002; Nguyen ve ark., 1994; Yoshikoshi ve Inoue, 1990). Enfekte balıklar, tankın dibinde yatar pozisyonda kalırlar veya çember çizerek veya dümdüz hızlıca yüzerler. Yassı balıklar genellikle daha az belirti gösterirler. Baş ve kuyruğun kalkmasıyla birlikte vücutları kıvrılarak alt kısımlarda uzunlamasına kalabilirler. Farklı türlerde sıklıkla gözlenen hava kesesinin aşırı şişmesi dışında enfeksiyonla ilişkili olarak makroskobik lezyon yoktur (Anonim, 2017a). Bunun yanında beyin ve retinadaki viral replikasyondan dolayı sinirsel belirtiler görülür (Arimoto ve ark., 1993b).

Farklı yazarlar tarafından tanımlanan ilerleyici pigmentasyon değişiklikleri dışında enfekte balıkların solungaçları ve vücut yüzeyi üzerinde eksternal klinik belirti yoktur. Çipuraların mandibula ve baş bölgesinde zaman zaman rapor edilen kutanöz erozyonlar muhtemelen görüş kaybının meydana getirdiği travmatik nedenlerdir (Anonim, 2017a).

Avrupa’da bulunan kuluçkahanelerde 2014-2016 yılları arasında çipura larvalarında yoğun ölümler görülmüştür. Bunlardan iki klinik salgın izlemeye alınmıştır. Spesifik klinik belirti göstermemelerine rağmen, etkilenen balıklarda yüksek mortalite ve histolojik olarak tipik VNN lezyonları tespit edilmiştir. Balıklarda farklı laboratuvar teknikleri ile yapılan testlerde betanodavirus pozitif bulunmuştur. Genetik karakterizasyonlarında ise RGNNV/SJNNV reassortant suşu tespit edilmiştir (Toffan ve ark., 2017). Hastalıktan sonra hayatta kalanların kötü performans gösterebildikleri bildirilmiştir (Costa ve Thompson, 2016; Johansen ve ark., 2004).

1.6. Teşhis

1.6.1.Örnekleme Stratejisi

Ölmek üzere olanlar ile yeni ölmüş balıklara ilaveten, iştahın azalmasıyla ilişkili olarak anormal yüzme davranışı gösteren ve ilerleyen pigmentasyon değişikliği ile karakterize balıklar potansiyel enfekte olarak değerlendirilmeli ve bu örnekler şüphenin konfirme edilmesi amacıyla örneklenmelidir. Sadece baş bölgesinin sağlanabildiği çok büyük örnekler dışında, normal olarak tüm balık laboratuvara gönderilmelidir. Surveyans programlarındaki örneklemede sağlıklı balıkların örneklenmesi, istatistiksel örnekleme modellerine göre adapte edilmelidir. Örneklerin alınması ile laboratuvardaki tanıya başlanması için aradaki geçen süre en fazla +4 °C’de 2-3 gün; -20 veya -80 °C’de 2-3- hafta olmalıdır (Anonim, 2017a).

Klinik belirtideki balıklardan 5-10 adetinin gönderilmesi tanısal amaçlar için uygundur. Potansiyel taşıyıcılar araştırıldığında ise balıklar bireysel olarak test edilmelidir. Tanısal amaçlar için hedef organlar beyin ve gözlerdir. Larval veya 1 cm’den küçük balıklardan şüphelenildiğinde tüm balık gönderilmelidir. Balık uzunluğu 1-6 cm ise beyin ve gözü içeren tüm baş bölgesi ayrılmalıdır. Daha büyük balıklarda beyin ve göz toplanmalıdır (Anonim, 2017a).

Beyin ve göz dışındaki diğer organların tanısal amaçlar için uygun olmadığı düşünülmelidir. Yine de yavru balıkların non-invaziv metotlarla test edilmesi durumunda yumurta, ovaryum ve seminal sıvılar ile gonadal biyopsiler uygun örnek olarak değerlendirilmelidir. Çoğu viral balık hastalığında tespit için önerilen böbrek, dalak ve kalp VNN tanısı için uygun değildir (Anonim, 2017a).

1.6.2. Teşhis Metotları

VNN teşhisinde, viral etkenin hücre kültüründe izolasyonunu takiben immunolojik veya moleküler tiplendirme uzun yıllar boyunca altın metot olarak kabul edilmiştir. Şimdilerde yüksek sensitivitede pek çok moleküler araç tanımlanmıştır, fakat bunların kesin kullanımları laboratuvarlar arası yeterlilik testleri aracılığıyla ileri validasyona veya altın metot ile eşleştirme testlerine gerek duyulmaktadır. Virus ayrıca, donmuş kesitler veya beyin imprintlerinde uygulanan immunofloresan (IF) ve beyin ile retinada immunohistokimyasal (IHC) olarak identifiye edilmiştir. IHC, histolojik analiz için fikze edilmiş materyallerde virus tespitinde en uygun testtir (Anonim, 2017a).

1.6.2.1. Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu

Tanı ve araştırmalar için betanodavirusların izolasyonu ve üretilmesinde iki balık hücre hattı bulunmaktadır. Bunlar, Stripe snakehead'tan köken alan SSN-1 hücre hattı (Frerichs ve ark., 1996) ve SSN-1'den klonlanan E-11 hücre hattıdır (Iwamoto ve ark., 2000). SSN-1 veya E-11 hücrelerindeki CPE, ince veya yuvarlak, kırılğan, vakuollü granüler hücreler ve monolayerin parsiyel veya bütün olarak parçalanması ile karakterizedir (Anonim, 2017a). SSN-1 hücre hattının tüm fry Stripe snakehead'ten oluşması sebebiyle, virus üremesi sırasında oluşan CPE nonspesifiktir ve uyumsuzluklar gözlenmektedir. Bu durum titrasyon gibi kantitatif analizleri çıkmaza sokmaktadır. Bu amaçla SSN-1'den klonlanan E-11'in, kantitatif analizler için daha uygun olduğu yapılan çalışma ile gösterilmiştir. Ayrıca SSN-1

hücre hattı retrovirus-C ile persiste enfektidir; bu durum hem moleküler hem histolojik testlerde saptanmaktadır. E-11 hücre hattında moleküler olarak tespit edilmesine rağmen, histolojik olarak saptanmamıştır (Iwamoto ve ark., 2000).

Duyarlılığı daha yüksek hücre hatları (GF-1) geliştirilmiş ve tanımlanmıştır (Chi ve ark., 1999). Barramundi'lerin (*Lates calcarifer*) beyin dokularından elde edilen BB hücre hattı (barramundi brain cell) hem in vitro hem in vivo şartlarda viral enfeksiyon ve replikasyon mekanizmalarının çalışılması için geçerli bir model olarak önerilmektedir (Chi ve ark., 2005).

Sakamoto ve ark. (2008), tarafından sağlıklı görünümdeki yabani deniz türlerinde VNN tespiti için yapılan epidemiyolojik araştırmada 729 balıktan 87 adeti Nested PCR ile pozitif tespit edilmelerine rağmen, E-11 hücre hattına inoküle edilen pozitif örneklerin hiçbirinde CPE elde edilememiş ve virus üretilenmemiştir. Araştırmacılar bu durumu, pozitif bulunan örneklerde ya CPE oluşturmak için yeterli virus titresinin bulunmamasına ya da viral RNA olmasına rağmen sadece virion veya enfektif kapsidinin olmayabileceğine bağlamışlardır (Sakamoto ve ark., 2008). Betanodavirusların cesium chloride gradients aracılığıyla ultrsantrifügasyon ile kolaylıkla pürifiye edilebileceği farklı araştırmacılar (Chive ark., 2001; Comps ve ark., 1994; Mori ve ark., 1992) tarafından bildirilmiştir.

1.6.2.2. İmmunofloresan

Klasik IF' a göre boyanmış beyin kesitleri, betanodavirus enfeksiyonunun tespiti için uygun bir metot olarak rapor edilmiştir. Sensitivitesinin bilinmemesinden dolayı, bu metot sadece klinik enfekte balıklarda önerilmektedir (Anonim, 2017a).

1.6.2.3. Histopatoloji

VNN'in histopatolojik tanısı, merkezi sinir sisteminin (MSS) geniş nekrozuna dayanır; etkilenen sinir hücrelerinin sitoplazmasında bulunan çok sayıda virus

partikülü, orta ve arka beyinde yaygın nöronal dejenerasyon ve retinada vakuolizasyon ile karakterizedir (Glazebrook ve ark., 1990; Nishizawa ve ark., 1995a). Larva ve juvenillerde bu lezyonlar çok daha fazla göze çarparken, semptomatik yetişkinlerde bazen çok nadirdir, bazen de tespit etmek zordur. Yangı prosesi genellikle çok ihtiyatlıdır ve makrofajların varlığı büyük ihtimalle sekonder enfeksiyonun sonucudur (Anonim, 2017a). Balıkların yaş farklılığına göre histolojik farklılıklar da ortaya çıkabilmektedir. Virusun doku dağılımında yaşa bağlı farklılık olmamasına rağmen, larvaların beyinde şiddetli nekroz görülürken, genç ve yetişkinlerin beyinlerinde daha yüksek virus konsantrasyonları varlığında bile daha düşük düzeyde nekroz görülebilmektedir (Mladineo, 2003).

Enfekte Asya levreği larvalarında genişlemiş, yuvarlak, bazofilik hücreler ile birlikte optik tektum, serebellum, tegmentum, vagal loblar, medulla oblongata ve omurilik hücrelerinde inklüzyon cisimcikleri ve sitoplazmik vakuoller tanımlanmıştır. Gözlenen vakuoller genellikle çok geniştir ve nöral madde kaybına neden olarak retina dahil olmak üzere dokularda süngerimsi bir görünüme neden olmaktadır (Renault ve ark., 1991). Atlantik halibut'ta VER'in doğal salgınları sırasında doku lezyonları ve solungaç tabanı hücrelerinde virus benzeri parçacıklar gözlenmiştir (Grotmol ve ark., 1997).

1.6.2.4. Elektron Mikroskobi

Elektron mikroskobik muayenede, beyin ve retina hücrelerinin dejenerasyonu gözlenir, 25 nm çapındaki virionlar nöronların sitoplazması içinde nükleer kromatin marjinasyonu göstererek bulunurlar. Virionlar retinada, ya sitoplazmada endoplazmik retikulum (ER)'e bağlanmış olarak ya da serbest olarak bulunabilir. Çekirdek membranının ayrılması ve mitokondrinin iç kristallerinin parçalanması gözlemlenebilir, bunun sonucu olarak sadece plazma membranının kalıntıları kalır (Glazebrook ve ark., 1990). Piknoz ve hücre lizisi gibi iki dejeneratif değişiklik te görülebilir. Hücre lizisi daha sık meydana gelir ve vakuolasyon ile yakından ilişkilidir. Piknotik hücrelerin sitoplazmalarında yoğun olarak virus parçacıkları

bulunur, birkaç dejenere mitokondri gözlenir ve hücreler yüksek oranda nekrotik görülür (Yoshikoshi ve Inoue, 1990).

1.6.2.5. Moleküler Teknikler

Hastalığın tanısında moleküler tanı metotlarının gelişmesiyle birlikte ilk önceleri konvansiyonel RT-PCR metodu kullanılmıştır. Devam eden çalışmalarda Nested PCR metotları geliştirilmiş ve kullanılmıştır. F2-R3 primerleri, RNA2 segmentinin T4 değişken bölgesi hedeflenerek dizayn edilmiştir (Anonim, 2017a). Dalla Valle ve ark. (2000) ve Thiéry ve ark. (1999), protokolleri akdeniz kökenli betanodavirusların tespiti için geliştirilmiştir. Grotmol ve ark. (2000)'nın protokolleri ise soğuk su suşlarının tespiti için geliştirilmiştir. Ancak Nested PCR, yüksek sensitivitesine rağmen, kontaminasyona yatkın olması ve fazla zaman alması gibi sebeplerden dolayı çok yoğun çalışan laboratuvarlar için uygun olmamaktadır (Panzarin ve ark., 2010). Bu nedenle daha güvenilir, sensitiv, kontaminasyonun en aza indirildiği ve daha kısa sürede sonuç veren pek çok Real Time RT-PCR metodu geliştirilmiştir (Baud ve ark., 2015; Dalla Valle ve ark., 2005; Grove ve ark., 2006; Hick ve Whittington, 2010; Hodneland ve ark., 2011; Korsnes ve ark., 2005; Nerland ve ark., 2007; Panzarin ve ark., 2010). RNA2 tespitinin RNA1 tespitinden 2-10 kat daha fazla olduğu ve Real Time testlerinde kapsid protein hedefli yaklaşımların daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Dalla Valle ve ark., 2005).

VNN OIE referans laboratuvarı tarafından geliştirilen TagMan temelli Real Time RT-PCR metodu (Panzarin ve ark., 2010), OIE standartlarına göre valide edilmiştir ve Atlantik cod (*Gadus morhua*) ile Atlantik halibut betanodaviruslarının yanı sıra yayınlanan dört genotipin tespiti için de uygun görülmektedir (Anonim, 2017a). Geliştirilen bu metodun hücre kültüründe virus izolasyonu veya Nested PCR'a göre 100 kat daha sensitiv olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Panzarin ve ark., 2010).

Genomik sekanslama, tanının konfirmasyonu için çok kıymetli olmasının yanı sıra, epidemiyolojik çalışmalar için de gereklidir. T4 değişken bölgesinin (Nishizawa

ve ark., 1997) sekans analizi, genotipin doğru tayin edilmesine imkan tanır. Ancak iki genomik segmentin sekansına dayalı filogenetik analiz, daha informatif görüldüğü ve farklı betanodavirus genotipleri arasında ve genotip içi meydana gelen olası reassortment durumlarının da ortaya konulmasında çok önemli olduğu bildirilmektedir (Olveira ve ark., 2009; Panzarin ve ark., 2012; Toffolo ve ark., 2007). Betanodavirusların ilk filogenetik analizi Toffolo ve ark. (2007), tarafından RNA1 ve RNA2 parsiyel sekansına göre yapılmıştır.

1.6.2.6. Serolojik Testler

Yeterli araştırma olmadığı için, şimdiye kadar spesifik antikorlar, balık populasyonlarının viral durumunun değerlendirilmesi için rutin bir izleme metodu olarak düşünülmemiştir. Yine de spesifik antikorların bulunduğu farklı yazarlar tarafından rapor edilmiştir. Saha araştırmalarına göre, ELISA titresinin $\geq 1:40$ olması viral enfeksiyonun göstergesi iken, $\leq 1:10$ değeri viral enfeksiyonun arılığının göstergesidir (Watanabe ve ark., 2000). Hedef dokulardan betanodavirus antijeni tespitinde de ELISA kullanılmıştır (Arimoto ve ark., 1992).

1.6.3. Tanı Metodunun Seçimi

VER/VNN'in, tanısı için pek çok metot bulunmaktadır. Hücre kültüründe virus izolasyonu ve identifiasyon testlerinin yanı sıra yüksek sensitiviteli moleküler tabanlı testler geliştirilmiştir. Sadece viral nükleik asidin tespitine olanak sağlayan moleküler tabanlı testlerin yüksek duyarlılıkları, düşük maliyetleri ve zaman tasarrufu gibi özellikleri avantaj sağlarken, virusun varlığını daha doğru bir ifadeyle aktif bir enfeksiyonu tanımlayan konvansiyonel metotlar da altın metot olarak avantaj sağlamaktadırlar. Bu nedenle VNN tanısında amaç, maliyet ve zaman gibi parametreler gözetilerek tanı yöntemi seçilmelidir. Hedeflenen surveylans ve tanısı için varolan metotlar Çizelge 1.4'te gösterilmiştir (Anonim, 2017a).

Çizelge 1.4. Betanodavirus surveylans, tespit ve tanı metotları (Anonim, 2017a).

Metot	Hedefli Sürveylans	Olası Tanı	Konfirmasyon Tanısı
Histopatoloji	d	c	d
Histopatoloji+İmmunboyama	c	b	a
Elektron Mikroskobi	d	c	d
Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu+İmmunboyama, RT-qPCR, RT-PCR, Sekans	b	a	a
RT-PCR	c	a	c
RT-PCR+Sekans	b	a	a
RT-qPCR	a	a	a

- a) Ulaşılabilirlik ve kullanılabilirlik/yararlılık ve tanısal spesifite ve sensitivitesinden dolayı tavsiye edilen metot
b) İyi tanısal sensitivite ve spesifitesi ile standart bir metottur, ancak maliyet ve ulaşılabilirliği uygulanmasını sınırlandırır
c) Metot bazı durumlarda uygulanır, ancak kesinlik/doğruluk/hassasiyeti ve diğer faktörler uygulanmasını çok sınırlandırır
d) Metot bu amaç için şu anda tavsiye edilmemektedir.

Bu metotların uygunluğu, güvenilirlik, sensitivite, spesifite ve yararlılık başlıkları üzerinde olmasından dolayı kısmen subjektiftir. Kategori a ve b olarak listelenen testlerin hepsinin resmi standardizasyonu ve validasyonu geçirilmemiş olmasına rağmen, rutin yapılış ve şüpheli sonuçlar olmadan geniş kullanımda olmasından dolayı, bu testleri kabul edilebilir kılmaktadır (Anonim, 2017a).

Hedefli sürveylans, duyarlı türlerin yetiştirildiği çiftliklerin düzenli olarak izlenmesi prensibinde olmalıdır. Şüphelenilen genotiplerin optimum sıcaklığı dikkate alınarak en uygun mevsimde, mümkün ise larval dönem ve juveniller örneklenmelidir. Sağlıklı populasyonlarda hastalıktan arılığın gösterilmesi için şuan için resmi veya önerilen bir test metodu bulunmamaktadır. RT-qPCR ve takibinde virus izolasyonu hedefli betanodavirus sürveylansı için en uygun metot olarak düşünülmelidir (Anonim, 2017a).

1.6.4. Destekleyici Tanı Kriterleri

1.6.4.1. Şüpheli Vakaların Tanımlanması

Aşağıdaki kriterlerden en az biri ile karşılaşırsa VNN hastalığından şüphelenilmelidir;

- a) Duyarlı türlerde anormal yüzme davranışları,
- b) Duyarlı türlerde bir populasyonda tipik histopatolojik lezyonların tespit edilmesi,
- c) Etkenin identifikasyonu yapılmadan hücre kültürlerinde tipik CPE gözlenmesi,
- d) Çizelge 1.4'te bildirilen "Olası Tanı"da a veya b olarak tanı testlerinden birinin pozitif sonuç vermesi,
- e) Enfekte çiftlikten diğerine canlı balık transferi,
- f) Enfekte bir çiftlik ve ikincil bir çiftlik arasında epidemiyolojik farklılıkların var olması,
- g) Spesifik antikor varlığının tespiti (Anonim, 2017a).

1.6.4.2. Konfirme Vakanın Tanımlanması

Konfirme bir VNN vakası, hücre kültüründe tipik bir CPE meydana getiren şüpheli bir vakanın etkenin izleyen identifikasyonunun serolojik, moleküler veya farklı bir tanı yöntemi ile ikinci bir pozitif sonuç alınmasıdır (Anonim, 2017a).

1.7. Korunma ve Kontrol

Betanodaviruslar, ciddi bir viral hastalığa neden olurlar ve hastalığın şu an için hiçbir tedavisi yoktur. Ancak, ümit verici aşı çalışmaları devam etmektedir (Nuñez-Ortiz ve ark., 2016). Kontrol stratejileri tasarlanırken virusun replikasyon kaynağı olan damızlıklar ve larvalar ile horizontal bulaşmadan sorumlu asemptomatik taşıyıcıların hedeflenmesi, ayrıca bulaşmanın kontrol altına alınması önemli bir husustur. Yetiştiricilik önlemleri VNN salgınlarını azaltmada etkilidir, ancak

tamamen kontrol etmek için yeterli değildir. Virus replikasyonunu engelleyen antiviral ilaçların kullanımı, balıklarda ve su ortamında viral yükün azaltılmasında umut veren diğer yöntemlerdir. Hem vertikal hem horizontal olarak bulaşabilen bir RNA virusunun neden olduğu VNN hastalığının mantıklı kontrolü; etkili biyogüvenlik önlemleri ve aşılamalardır (Costa ve Thompson, 2016).

1.7.1. Biyogüvenlik Önlemleri

Kuluçkahaneye giren suya UV muamelesi, sanitasyon bariyerlerinin konulması, biyolojik filtrelerin ve tankların düzenli dezenfeksiyonu ve nadasa bırakılması, alet ve gereçlerin dezenfeksiyonu, beslemede kullanılan işlenmemiş balıklardan kaçınmak gibi genel hijyen uygulamalarına ek olarak, anaçlar için yeterli yem sağlanması, larva ve juvenillerin stok yoğunluğunun azaltılmasını içeren üremeyi indükleyici metotlar ile stres faktörlerinin azaltılması önemlidir (Mushiake ve ark., 1994).

Etkili dezenfeksiyon prosedürlerinin uygulanması, VER'in kontrol edilmesine yardımcı olabilir. SJNNV ile yapılan çalışmalar, virus partiküllerinin pH 12'de ve sodyum hipoklorit, kalsiyum hipoklorit, benzalkonyum klorür ve iodin ile tamamen inaktive olduğunu göstermektedir (Arimoto ve ark., 1996). SBNNV, ısıl işlem, ultraviyole ışık (UV) ve ozon ile etkin bir şekilde etkisiz hale gelirken; formalin, etanol, metanol, eter ve kloroform, virusun inaktivasyonunda etkili değildir (Frerichs ve ark., 2000).

Larval dönemde vertikal bulaşma duyarlılığının yüksek olması nedeniyle ile, mortaliteyi azaltmak için önlemlerin alınması önemlidir (Mori ve ark., 1998). Striped jack, sevenband grouper, barfin flounder ve Atlantik halibutların larva üretiminde hastalığın kontrol altına alınmasında; fertil yumurtaların ozonla muamele edilmiş deniz suyunda yıkanması veya besleme suyunun ozonla muamelesi veya klorlama etkili yöntemlerdir (Arimoto ve ark., 1996; Grotmol ve Totland, 2000; Mori ve ark., 1998; Watanabe ve ark., 2000).

Kuluçkahanelerde vertikal bulaşmadan kaçınmak için, gonadal biyopsilerde PCR metotlarının yürütülmesiyle taşıyıcı anaçların tespit edilmesi ve bütün pozitiflerin çıkarılması önerilmektedir (Mori ve ark., 1998; Mushiake ve ark., 1994, Nishizawa ve ark., 1994). Buna rağmen seçili anaçlarda virus enfeksiyonun PCR ile tespitinin bazı durumlarda başarısızlığa uğradığı da bildirilmiştir (Nishizawa ve ark., 1996). ELISA ile anaçlarda virusa karşı antikorların taranması da sağlıklı sürülerin oluşturulması açısından önemlidir (Watanabe ve ark., 2000). Betanodavirus saçılımı, sıklıkla yumurtlama mevsiminde meydana geldiğinden yumurtlama sayısını sınırlamak ta vertikal bulaşma insidansını azaltmaktadır (Mushiake ve ark., 1994).

1.7.2. Aşılama

Son 20 yıldan beri pek çok inaktif, rekombinant, virus benzeri partikül (Virus-like particles-VLPs) ve DNA aşısı, sahada ve laboratuvarlarda denenmektedir. Orta şiddetten yüksek şiddete kadar farklı hastalık tablolarında rölatif hayatta kalma oranlarına (relative percent survival-RPS) göre, aşılarda korunmaları ya azdır ya da hiç yoktur (Costa ve Thompson, 2016). 2017 yılında güncellenen OIE Akuvatik El Kitabı'na göre, betanodavirus aşısı ile ilgili yoğun araştırmalara rağmen, Japonya'daki seven-band grouper VER'ine karşı inaktif RGNNV aşısı dışında hiçbir ticari aşının henüz mevcut olmadığı bildirilmiştir (Anonim, 2017a). Ancak son gelişmeler takip edildiğinde, 2018 yılı Şubat ayında Norveç menşeli, Akdeniz havzasında yaygın olarak bulunan RGNNV genotipine karşı “ALPHA JECT micro® 1Noda” isimli ilk inaktif ticari aşının geliştirildiği bildirilmiştir (Anonim, 2018c). Aşının İspanya, İtalya, Hırvatistan ve Yunanistan tarafından da resmi onay aldığı bildirilmektedir (Anonim, 2018d).

1.7.2.1. Aşı Çalışmaları

1.7.2.1.1. İnaktif Aşılar

Formalinle inaktive edilmiş RGNNV aşılarının sevenband grouper balıklara intraperitoneal olarak verilmesiyle yapılan denemelerde, enjeksiyonun 10. günden sonra nötralizan antikorların oluşmaya başladığı; 160. günden sonraki RPS değerinin % 67 veya daha üstü, 9. haftadaki değerin ise % 85 olduğu ortaya konulmuştur (Yamashita ve ark., 2005) . DKID₅₀ değeri 10⁻⁷ olan aşı denemelerinde ise hastalıktan tam korunma için gerekli nötralizan antikor titresinin 1/200 veya daha yüksek olması gerektiği bildirilmiştir (Yamashita ve ark., 2009a). Formalinle inaktive edilmiş başka RGNNV aşı denemelerinde de nötralizan antikorların varlığı ortaya konulmuş, ayrıca deneysel enfeksiyon çalışmalarında bu antikorların beyin ve böbrekte virusun replikasyonunu baskıladığı kanıtlanmıştır (Pakingking ve ark., 2009; Pakingking ve ark., 2010).

1.7.2.1.2. Rekombinant Aşılar

VNN için rekombinant protein ekspresyonu ile aşı geliştirilmesine yönelik artan bir ilgi vardır (Costa ve Thompson, 2016). Nakai ve ark. (1995), tarafından *Escherichia coli*'de eksprese edilen, SJNNV'nin rekombinant kapsid proteini, striped jack türü balıklara i.m. olarak uygulandığında nötralizan antikorların oluştuğu gösterilmiştir. Benzer rekombinant protein aşıları RGNNV genotipi kullanılarak, sevenband grouper'lerde (Tanaka ve ark., 2001) ve humpback (kambur) grouper (*Cromileptes altivelis*)'lerde (Yuasa ve ark., 2002) yapılmış ve yüksek titrede nötralizan antikorlar elde edilmiştir. Ancak denenen bu aşılar, farklı artan dozlarında azalan RPS çelişkisinden dolayı ticari olarak geliştirilememiştir (Tanaka ve ark., 2001). Asya levreğinden izole edilmiş virustan elde edilen rekombinant kapsid proteininin 50 µg doz ile yapılan başka bir denemede ise juvenil boylarda % 76 RPS elde edilmiştir (Vimal ve ark., 2014).

1.7.2.1.3. Virus Benzeri Parçacıklar

Virus benzeri parçacıklar (Virus like particles-VLP) betanodavirus enfeksiyonları için bir aşı alternatifidir (Costa ve Thompson, 2016). Malabar orfoz (*Epinephelus malabaricus*) ve ejderha orfozunun (*Epinephelus lanceolatus*) *Escherichia coli*' den eksprese edilen betanodavirus VLP ile immünizasyonunda; nötralizan antikorların 4. haftada (w.p.i.) yüksek titrede olduğu, raphel (booster) uygulaması ile de bu seviyenin daha da arttığı ortaya konulmuştur. Ayrıca antikor yanıtını artırmak için adjuvanın gereksiz olduğu ve VLP immunizasyonunda yüksek antikor titrelerinin 5 aydan fazla devam ettiği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2006). Turuncu benekli grouperlerde (orfoz) (*Epinephelus coioides*) *Escherichia coli*'de üretilen tek doz VLP'nin, 1 haftada (w.p.i.) yüksek titre nötralizan antikor oluşturduğu, enjeksiyondan 12 saat sonra (h.p.i.) karaciğer, dalak ve ön böbrekte hücrel ve doğal bağışıklık ile ilgili genleri aktive ettikleri gösterilmiştir (Lai ve ark., 2014). Thierry ve ark. (2006), tarafından, Avrupa levreklerinde, bakalovirustan eksprese edilen kapsid proteini kullanılarak RGNNV VLP'nin hem immun yanıt hem challenge'a karşı koruyucu etkisi ortaya konulmuştur, ayrıca immunizasyondan 30 gün sonra % 89'a kadar yüksek bir RPS değerine ulaşılmıştır (Thierry ve ark., 2006). *Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanılarak üretilen RGNNV VLP'nin *Epinephelus septemfasciatus* orfozunda oral ve i.p. uygulamalarının RPS üzerinde etkisi incelenmiş; sırasıyla % 50 ve % 100 gibi çok farklı değerler bulunmuştur (Wi ve ark., 2015).

1.7.2.1.4. Sentetik Peptit Aşıları

Sentetik peptidlerin Betanodavirus aşıları olarak kullanılabilirliğinin fizibilitesi de incelenmiştir. Bu aşıları geliştirmek için koruyucu epitopların bilgisinin gerekli olduğu bildirilmektedir (Winton, 1998). Bu konudaki ilk çalışmalarda potansiyel sentetik peptitlerin kullanımları araştırılmış ve betanodavirusun N-terminal peptidinin korunmada rol oynadığı ileri sürülmüştür (Coourdacier ve ark., 1999; Coourdacier ve ark., 2003).

1.7.2.1.5. DNA Aşıları

VER'in kontrolü için DNA aşılarının kullanımının fizibilitesi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan bazıları, diğer balık virusları ile çapraz reaksiyon veren ve nonspesifik immun yanıt oluşturarak hastalıktan korumayı amaçlayan infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) veya viral hemorajik sepsis virusu (VHS) kökenli DNA aşılarıdır. İlk haftalardaki % 100 olan RPS değerleri, 5. haftadan sonra % 63'lerin altına inmektedir (Sommerset ve ark., 2003; Sommerset ve ark., 2005). Başka bir DNA aşı çalışmasında, aşının TLR9, Mx, IL-1 β , spesifik antikorlar ve Th1 ve Th2 belirteçleri T-bet ve GATA-3'ün yukarı regülasyonu ile hem doğal hem de kazanılmış immun yanıtları indüklediği ortaya konulmuştur. Ayrıca aynı çalışmada adjuvan kullanımının RPS seviyesini bir miktar artırdığı bildirilmiştir (Chen ve ark., 2015d).

1.7.2.2. Aşılama Yöntemleri

Aşı çalışmalarının çoğu, yavru olmayan balıklarda i.m. veya i.p. enjeksiyon ile yapılmaktadır. Betanodaviruslar genç balıkları, özellikle de larvaları ve yavruları etkilediğinden dolayı aşıların enjeksiyon yoluyla verilmesi zorlaşır. Ayrıca çoğu zaman da balıklar tam olarak immunokompetant olmadığı için uygun değildir. Yavru balıkların immunokompetant olmamasına rağmen yine de diğer kitlesel aşılama yöntemleri üzerine çalışmalar devam etmektedir (Costa ve Thompson, 2016). Konuyla ilgili olarak yavrularda yem olarak kullanılan artemialara kapsüllendirilmiş rekombinant NNV aşısı oral olarak uygulandığında daha önceki denemelerden daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (Chen ve ark., 2011; Lin ve ark., 2007).

Alternatif başka bir aşılama yolu olarak banyo aşılaması denenmiştir. Kapsüllenmiş veya kapsüllenmemiş formalin ile inaktive edilmiş betanodavirusun, turuncu benekli grouper larvaları (0.2 g) banyo yoluyla immunizasyon denemeleri yapılmıştır. İnaktif aşı, patentli Alarvita Biolife Co teknolojisi ile nano-kapsülleme gerçekleştirilmiş ve daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Araştırmacılar ayrıca,

kapsüllenmemiş virusun 0.4 mM binary ethylenimine (BEI) ile inaktivasyonunda ; % 79 <RPS <95, 0.1-0.2 formalinle inaktivasyonunda ise; % 39 <RPS <43 değeri elde etmişlerdir. BEI ile inaktive edilmiş betanodavirus koruması 30. günde (d.p.v.) pik değere ulaşmış ve en az 3 ay koruma sağlamıştır (Kai ve Chi, 2008).

VNN virusunun vertikal bulaşma özelliğinden dolayı, anaçların aşılınması da bir başka alternatiftir. Kai ve ark. (2010), tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, 35-60 kg'lık patates grouperleri (*Epinephelus tukula*) Freund's complete adjuvantlı inaktif betanodavirus aşısı ile i.m. yolla immunize edilmiştir ve immunize edilmeyenlere göre vertikal bulaşma riskinin önemli derecede azaldığı ortaya konulmuştur. Aşılamadan sonraki 5. ayda bile spesifik antikorların, aşılanmayanlara göre hala yüksek seviyede olduğu, bu anaçlardan elde edilen yumurtalarda da virusun saptanmadığı, aşılanmayanlarda ise virusun aktivitesini hala devam ettirdiği bildirilmiştir (Kai ve ark., 2010).

Reishi immünomodülatör protein gibi immünostimülatör bileşiklerin uygulanması da, larva boy balıkların adaptif bağışıklık sisteminin tam olarak gelişmesinden önce bağışıklık yanıtını arttırmak için önerilmiştir (Kuan ve ark., 2012). Canlı NNV ile birlikte uygulanan Poly I: C'nin, sevenband grouperlerde, hem laboratuvar koşulları altında (Nishizawa ve ark., 2011) hem de saha uygulamalarında (Oh ve ark., 2012) koruma sağladığı gösterilmiştir. Saha çalışmalarında, VNN salgınından 20 gün sonra uygulanan Poly I: C, balıkların hayatta kalma oranlarını artırmış ve bu koruma 10 aydan daha uzun bir süre devam etmiştir (Oh ve ark., 2012).

Isı uygulamalarındaki değişiklikler de aşılarda etkinliği üzerine önemli bir faktördür. Optimum 26 °C'de yetiştirilen balıklara, canlı aşı uygulamasının 17 ° C'de yapılmasının VNN enfeksiyonlarında hayatta kalma yüzdesini artırdığı gösterilmiştir (Nishizawa ve ark., 2012). Tanaka ve ark. (1998), su sıcaklığının VER gelişimini etkileyebileceğini ve daha yüksek su sıcaklıklarında daha erken ve daha yüksek ölüm oranlarının ortaya çıkabileceğini bildirmiştir.

Aşıların miks kullanımlarının da korunmadaki etkileri araştırılmıştır. Balıklar ya canlı apatojen aquabirnavirus (ABV) (i.m.) veya inaktif RGNNV (i.p.) ya da her ikisi ile birlikte immunize edilmiştir. Daha sonra RGNNV ile challenge uygulaması yapılmıştır. ABV ve inaktif RGNNV'yi birlikte alan balıklar, 3 d.p.v. kadar erken bir zamanda % 60'ın üzerinde bir RPS göstermiştir. ABV'nin, enfeksiyonun çok erken aşamalarında RGNNV'ye karşı spesifik olmayan koruma sağlayan potansiyel bir immünomodülatör aktiviteye sahip olduğu ileri sürülmüştür (Yamashita ve ark., 2009b).

VNN' in aşılama yoluyla kontrol edilmesi çok umut vericidir. Pek çok inaktif ve rekombinant aşı çalışmaları önemli bir korunma sağlandığını göstermektedir. Bununla birlikte, genotipler arasında çapraz bağışıklık görülmemektedir; balıklar aynı anda birden fazla genotip ile enfekte olabilir, bu nedenle farklı genotiplerden korunmak için multivalan bir aşıya ihtiyaç duyulabilmektedir. NNV, hücre içi patojen olduğundan, virusa karşı etkili bir adaptif yanıt sağlamak için hem B hücresi hem de CTL aktivitelerine gereksinim vardır (Costa ve Thompson, 2016). Uygulanan antijen türü ve izlediği immunizasyon stratejisinin bu yanıtı etkilediği bilinmektedir. Canlı, attenüe veya DNA aşıları gibi hücre içi yoldan antijenlerin sunumu MHC-I bağımlı CD8 + yanıtlarını (yani CTL'ler) indüklerken, inaktif ve rekombinant protein aşıları gibi hücre dışı uygulama ise MHC-II bağımlı CD4 + yanıtlarını (örneğin antikor tepkileri) indüklemektedir (Munang'andu ve ark., 2015).

1.8. Tedavi

Virus replikasyonunu inhibe eden kimyasalların kullanımı incelenmiş ve betanodavirus tropizminin monoamin nörotransmitter sistemini içerdiği öne sürülmüştür (Huang ve ark., 2014). Anti-RdRp olan Ribavirinin (1-b-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide), betanodavirus enfeksiyonuna etkisi araştırılmış ve RGNNV RdRp ile etkileştiği; viral enfeksiyonu in vitro olarak inhibe ettiği ortaya konulmuştur (Huang ve ark., 2015). Oligonol (saflaştırılmış fenolik ekstraktı lyche'nin meyvesi)'un, enfeksiyonun erken evrelerinde uygulandığında

muhtemelen virusun hücreye bağlanmasını engelleyerek viral yükü azalttığı ortaya konulmuştur (Ichinose, 2013).

Betanodavirus enfekte balıkların tedavisinde, AMP'lerin (antimikrobiyal peptitler) kullanımı ile konakçının immun yanıtını modüle etme kabiliyetleri olası bir yöntem olarak önerilmiştir. Balıklara iki AMP, TH1-5 (tilapia hepcidin 1-5) ve Epi-1 (epinisin-1) verildiğinde, TH1-5'in enfeksiyon sırasında viral yükü azaltmaya yardımcı olduğu, Epi-1'in ise enfeksiyon sırasında ve sonrasında virusu temizlediği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2015).

Malabar orfoz larvalarına grouper (orfoz, lahos) IFN ve somon IFN i.p. veya oral yolla uygulandığında, grouper betaodaviruslarına karşı önemli bir koruma sağladığı gözlemlenmiştir (Kuo ve ark., 2016).

Bu çalışmanın amacı, Türkiye'de kültürü yapılan tüm levrek kuluçkahaneleri ve bazı levrek yetiştirme işletmelerinde VNN virusunun yaygınlığının araştırılmasıdır. Çalışma kapsamında kullanılacak Kantitatif Real-Time RT-PCR ve hücre kültüründe virus izolasyonu ile enfekte işletmeler tespit edilecektir. Türkiye'de ve dünyada ihbari mecburi bir balık hastalığı olmamasına rağmen, önemli ekonomik kayıplara neden olan ve uluslar arası balık ve balık ürünleri ticaretinde önemli bir yer tutan VNN virusunun yaygınlığının araştırılması ile levrek kuluçkahanelerinin enfeksiyon kapasitesi ve levrek yetiştirme işletmelerinin virus epidemiyolojisindeki rolleri ortaya konulacaktır.

Araştırmada, saha çalışmalarına başlamadan önce OIE tarafından önerilen ve Panzarın ve ark. (2010), tarafından geliştirilen Real Time RT-PCR metodu Balık Hastalıkları Ulusal Referans Laboratuvarı olan İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Viroloji Bölümü'nde optimize edilerek, hali hazırda hücre kültüründe virus izolasyonunu takiben Nested PCR olan metodun yerini alarak teşhis süresinin kısılmasına katkı sağlayacaktır.

Araştırmanın birinci kısmında, ülkemizde bulunan tüm levrek kuluçkahanelerindeki farklı yaş gruplarına ait döllenmiş yumurta, prelarva, postlarva, fry ve fingerling boy levrekler VNNV yönünden belirtilen metot ile taranacak ve olası viral kapasite ortaya konulacaktır. Ayrıca virusun tespiti halinde yapılacak retrospektif epidemiyolojik çalışma ile kontamine kuluçkahaneler ile ilişkisi bulunan işletmeler taranacak ve bu işletmelerdeki durum ortaya konulacaktır. Ayrıca kuluçkahanelerde enfeksiyonun veya virus varlığının hangi aşamada başladığı ve enfeksiyon süreci takip edilecektir.

Araştırmanın ikinci kısmında, levrek yetiştirme işletmelerinde VNNV'nin yaygınlığının, epidemiyolojik temelli bir modelleme ile araştırılmasıyla da küçük, orta ve büyük boy levreklerde virusun ülkemizdeki yaygınlığı araştırılacak, ayrıca ilişkili bulunduğu kuluçkahanelerdeki virusun durumunun karşılaştırılmasıyla; viral bulaşmanın olası kaynağının (yavru alışverişi, su, yem vs.) ortaya konulması sağlanacaktır. Bu bağlamda söz konusu tez projesi ile;

- Levrek kuluçkahanelerinde döllenmiş yumurta, prelarva, postlarva, fry ve fingerling boy balıklarda hastalığın araştırılması ile enfeksiyon kaynaklarının belirlenmesi, ayrıca kuluçkahanelerde enfeksiyonun veya virus varlığının hangi aşamada başladığı ve enfeksiyon süreci takip edilecek,
- Levrek yetiştirme işletmelerinde hastalığın araştırılması ile ülkemizde mevcut epidemiyolojik durum ortaya konulacak,
- Levrek kuluçkahaneleri ile işletmeleri arasında olası bulaşma durumlarının ortaya konulması ile riskler belirlenenecek,
- Ayrıca virusun tespiti halinde yapılacak retrospektif epidemiyolojik çalışma ile kontamine kuluçkahane/yetiştirme işletmeleri izlenecek ve bunlarla ilişkili olan diğer kuluçkahane/yetiştirme işletmeleri izlenerek bu işletmelerdeki virusun durumu ortaya konulacak,
- Çalışma ile olası tespit edilecek izolatlarda moleküler araştırmaların yapılarak, izolatlar arası farklılıklar moleküler düzeyde ortaya konulacak,
- Genetik dizilimlerin ortaya konulmasıyla filogenetik analizler yapılacak ve bu sayede ileride geliştirilebilecek aşı çalışmalarına değerli veriler sağlayacak,

- Söz konusu çalışma ile hem levrek kuluçkahaneleri hem levrek yetiştirme işletmeleri bir bütün olarak düşünüldüğünde, tüm yaş gruplarının bir arada incelendiği bir çalışma olacak,
- Ayrıca Real Time RT-PCR metodunun laboratuvarda optimize edilmesiyle, teşhis süresinin kısılmasına ve maliyetin azalmasına katkı sağlayacaktır.



2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Örnekleme ve Kayıt

Örnekleme, virusun aktif olarak bulunduğu su ısının optimum gelişme ısısına (25-30 °C) en yakın bulunduğu yaz ve erken sonbahar aylarında yapılmıştır. Örneklemede ayrıca işletmelerin coğrafi konumu, hastalık geçmişleri, kaç yıldır faal oldukları, enfekte ülkelerle herhangi bir balık veya balık ürünü alışverişinin olup olmadığı, ülke içinde hangi işletmelerle ilişki halinde olduğu, örnekleme zamanındaki güncel su ısısı, hava şartları gibi bilgiler de bilgi formuna yazılmıştır.

Kuluçkahane örneklemesinde virusun daha aktif olduğu yaz mevsimi zorunlu tutulmamıştır. Kuluçkahane sistemlerinin gerek kapalı sistemler olmaları, gerek kuluçkahane ısının dış ortamdan daha düşük olması gibi faktörler gözönüne alınarak örnekleme üretimlerin aktif olduğu tarihlerde yapılmıştır. Dölllenmiş yumurta örneklemesinde ise işletmelerin üretim planlamaları da dikkate alınarak mümkün olduğunca doğal yumurtalamanın gerçekleştiği Ocak-Mart ayları arasında örnekleme yapılmıştır.

2.1.1.1. Kuluçkahane Örneklemesi

Levrek kuluçkahanelerinde VNN virusun yaygınlığının tespiti amacıyla ülkemizde kayıtlı tüm levrek kuluçkahanelerinin örneklenmesi hedeflenmiştir. Her kuluçkahaneden alınacak örnek sayısının belirlenmesinde OIE tarafından önerilen surveylans tablosuna göre % 10 prevalans, % 100 sensitivite ve spesifite hesabına uygun gelen 30 sayısı hesaplanmıştır. Bu amaçla dört farklı yaş grubundan (dölllenmiş yumurta, prelarva, fry ve fingerling) 30'ar adet olmak üzere (Anonim, 2015) her kuluçkahaneden toplam 120 adet levrek örneklenmesi amaçlanmıştır.

Üretim dönemleri ve faaliyet durumları farklılık göstermekle birlikte Balıkçılık ve Su Ürünleri Genel Müdürlüğü 2014 yılı verilerine göre ülkemizde toplam 21 adet levrek kuluçkahanesi bulunmaktadır. Kayıtlı tüm kuluçkahanelerin faaliyette olması durumunda alınacak toplam örnek sayısının 2520 adet olması öngörülmekteydi.

İlk planlamadaki üretim dönemi örneklemede virusun farklı yaş dağılımlarında daha iyi tespit edilebilmesine imkan sağlamak amacıyla kuluçkahane örneklemesine postlarva dönemi de eklenmiştir. Bu durumda kuluçkahanelerdeki örneklenen üretim dönemleri sırasıyla; döllenmiş yumurta, prelarva, postlarva, fry ve fingerling olarak belirlenmiştir (Çizelge 2.1).

Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün resmi izinleri çerçevesinde İl Gıda ve Tarım Müdürlükleri ile yapılan yazışmalar neticesinde faaliyette bulunan kuluçkahaneler ve üretim dönemleri belirlenmiştir. Resmi yazışmalar sonucunda 2016 yılı itibarıyla Türkiye'de toplam 18 aktif kuluçkahanenin olduğu belirlenmiştir. Belirlenen kuluçkahanelerin ticari isimlerinin saklı kalması amacıyla herbirine K-1'den başlayarak K-18'e kadar kod numarası verilmiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 çalışma programı dahilinde tez çalışmasına başlanmış, ancak kuluçkahanelerdeki özel durumlar, ekonomik durumlar, yangın ve sel gibi doğal felaketler, üretim dönemi değişikliği veya üretimden vazgeçme gibi sebeplerden dolayı planlanan tüm dönemlerin örnekleme yapılamamıştır. İlk planlamada bulunan K-7 ve K-16 kodlu kuluçkahanelerde bahsedilen sebeplerden dolayı üretim olmadığından örnekleme yapılamamıştır (Çizelge 2.2). Mevcut imkanlar dahilinde tez çalışması sırasında aktif olan 16 kuluçkahanenin mevcut üretim dönemlerinden örnekleme gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.2). Kuluçkahanelerin kapalı sistemler olması ve ilgili üretim dönemlerine göre ısı stabilitelerini sağlamalarından dolayı, tez çalışmasını etkilemeyeceği göz önünde bulundurularak ilk planlanan örnekleme tarihlerinde bazı değişiklikler yapılmıştır.

Çizelge 2.1. Aktif levrek kuluçkahaneleri ve örnekleme tarihleri (planlanan).

Sıra No	İl	Kuluçkahane Kodu	Döllenmiş Yumurta	Prelarva (0-5 Gün)	Postlarva (5-40 Gün)	Fry (40-80 Gün)	Fingerling (80-120 Gün)
1	Adana	K-1	8-10 Mayıs 2017	8-10 Mayıs 2017	8-10 Mayıs 2017	8-10 Mayıs 2017	8-10 Mayıs 2017
2	Aydın	K-2	19-22 Aralık 2016	19-22 Aralık 2016	19-22 Aralık 2016	22-25 Mayıs 2017	-
3	Aydın	K-3	19-22 Aralık 2016	19-22 Aralık 2016	19-22 Aralık 2016	22-25 Mayıs 2017	-
4	Aydın	K-4	24-27 Nisan 2017	24-27 Nisan 2017	24-27 Nisan 2017	24-27 Nisan 2017	-
5	Aydın	K-5	-				24-27 Temmuz 2017
6	Muğla	K-6	20-23 Şubat 2017	20-23 Şubat 2017	20-23 Şubat 2017	10-13 Nisan 2017	10-13 Nisan 2017
7	Muğla	K-7	6-9 Mart 2017	6-9 Mart 2017	6-9 Mart 2017	6-9 Mart 2017	-
8	Muğla	K-8	6-9 Mart 2017	6-9 Mart 2017	6-9 Mart 2017	-	-
9	Muğla	K-9	23-26 Ocak 2017	23-26 Ocak 2017	23-26 Ocak 2017	6-9 Mart 2017	6-9 Mart 2017
10	Muğla	K-10	20-23 Şubat 2017	20-23 Şubat 2017	20-23 Şubat 2017	10-13 Nisan 2017	10-13 Nisan 2017
11	Muğla	K-11	20-23 Şubat 2017	20-23 Şubat 2017	20-23 Şubat 2017	10-13 Nisan 2017	12-15 Haziran 2017
12	İzmir	K-12	2-5 Ocak 2017	2-5 Ocak 2017	-	-	-
13	İzmir	K-13	13-16 Mart 2017	13-16 Mart 2017	13-16 Mart 2017	13-16 Mart 2017	7-10 Ağustos 2017
14	İzmir	K-14	2-5 Ocak 2017	2-5 Ocak 2017	7-10 Şubat 2017	7-10 Mart 2017	8-11 Mayıs 2017
15	İzmir	K-15	-	-	-	24-27 Nisan 2017	8-11 Mayıs 2017
16	İzmir	K-16	-	-	-	-	-
17	İzmir	K-17	12-15 Aralık 2016	12-15 Aralık 2016	3-6 Nisan 2017	3-6 Nisan 2017	7-10 Ağustos 2017
18	Çanakkale	K-18	14-16 Şubat 2017	14-16 Şubat 2017	14-16 Şubat 2017	30-31 Temmuz 2017	30-31 Temmuz 2017

Çizelge 2.2. Örnekleme yapılan kuluçkahaneler ve üretim dönemleri (gerçekleşen).

Sıra No	İl	Kuluçkahane Kodu	Dölllenmiş Yumurta	Prelarva (0-5 Gün)	Postlarva (5-40 Gün)	Fry (40-80 Gün)	Fingerling (80-120 Gün)
1	Adana	K-1	Üretim İptal	Üretim İptal	8-10 Mayıs 2017	8-10 Mayıs 2017	8-10 Mayıs 2017
2	Aydın	K-2	Üretim İptal	21 Aralık 2016	21 Aralık 2016	02 Ağustos 2017	-
3	Aydın	K-3	Üretim İptal	31 Mayıs 2017	31 Mayıs 2017	31 Mayıs 2017	-
4	Aydın	K-4	Üretim İptal	Üretim İptal	31 Mayıs 2017	31 Mayıs 2017	31 Mayıs 2017
5	Aydın	K-5	-				02 Ağustos 2017
6	Muğla	K-6	13 Şubat 2017	13 Şubat 2017	13 Şubat 2017	28 Mart 2017	28 Mart 2017
7	Muğla	K-7	Üretim İptal	Üretim İptal	Üretim İptal	Üretim İptal	Üretim İptal
8	Muğla	K-8	28 Mart 2017	Üretim İptal	28 Mart 2017	28 Mart 2017	-
9	Muğla	K-9	13 Şubat 2017	13 Şubat 2017	13 Şubat 2017	13 Şubat 2017	13 Şubat 2017
10	Muğla	K-10	Üretim İptal	Üretim İptal	28 Mart 2017	28 Mart 2017	28 Mart 2017
11	Muğla	K-11	Üretim İptal	Üretim İptal	Mart 2017	Üretim İptal	Üretim İptal
12	İzmir	K-12	4 Ocak 2017	4 Ocak 2017	-	-	-
13	İzmir	K-13	16 Mart 2017	16 Mart 2017	16 Mart 2017	16 Mart 2017	Üretim Yok
14	İzmir	K-14	3 Ocak 2017	3 Ocak 2017	3 Ocak 2017	7 Mart 2017	7 Mart 2017
15	İzmir	K-15	-	-	-	24 Nisan 2017	24 Nisan 2017
16	İzmir	K-16	-	-	-	-	-
17	İzmir	K-17	13 Aralık 2016	13 Aralık 2016	12 Nisan 2017	12 Nisan 2017	Üretim İptal
18	Çanakale	K-18	15 Şubat 2017	15 Şubat 2017	15 Şubat 2017	31 Temmuz 2017	31 Temmuz 2017

2.1.1.2. Yetiştirme İşletmesi Örneklemesi

Balıkçılık ve Su Ürünleri Genel Müdürlüğü 2014 yılı verilerine göre ülkemizde toplam 418 adet levrek yetiştirme işletmesi bulunmaktadır. Araştırmada örneklenecek işletme sayısının belirlenmesinde Cannon (2001) tarafından geliştirilen formüle göre hesaplama yapılmış, % 95 güven aralığı, % 100 sensitivite ve % 15 tahmini prevalans dikkate alınarak yapılan hesaplama göre 20 işletmenin örnekleneceği belirlenmiştir. Her işletmede örneklenecek balık sayısının belirlenmesinde ise OIE tarafından önerilen surveylans tablosuna göre % 10 prevalans, % 100 sensitivite ve spesifikite hesabına uygun gelen 30 örnek sayısı alınmıştır (Anonim, 2015). Bu amaçla levrek yetiştirme işletmelerinden farklı büyüklükte 30'ar adet balık tesadüfi örnekleme yöntemi ile alınmıştır. Buna göre levrek yetiştirme işletmelerinden alınacak toplam örnek sayısının 600 adet olması planlandı.

Yetiştirme işletmelerinin örnekleme programlarının planlanmasında, işletmelerin bulunduğu denizlerin yıllık su sıcaklıklarının aylara göre dağılımları araştırılmış ve virusun en aktif olabileceği dönemler göz önüne alınmıştır. İşletmelerdeki özel durumlar, ekonomik durumlar, yangın ve sel gibi doğal felaketler, üretim dönemi değişikliği veya üretimden vazgeçme gibi herhangi bir sebepten dolayı örnekleme yapılamaması ihtimali gözünde bulundurularak hesaplanan 20 işletmeye, 4 işletme daha eklenmiştir. 20 işletmenin tamamının örneklenebilmesi durumunda sonradan ilave edilen 4 işletme prevalans hesabına alınmayacaktır (Çizelge 2.3).

Rastgele örnekleme yöntemi ile belirlenen levrek yetiştirme işletmeleri ticari isimlerinin saklı kalması amacıyla herbirine Y-1'den başlayarak Y-24'e kadar kod numarası verilmiş ve örnekleme programı oluşturulmuştur (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Örneklenecek levrek yetiştirme işletmeleri ve örnekleme tarihleri.

Sıra No	İl	İlçe	İşletme Kodu	Tür	Örnekleme Tarihi
1	Muğla	Milas	Y-1	Levrek	22-24.08.2016
2	Muğla	Milas	Y-2	Levrek	22-24.08.2016
3	Muğla	Milas	Y-3	Levrek	22-24.08.2016
4	Muğla	Milas	Y-4	Levrek	22-24.08.2016
5	Muğla	Milas	Y-5	Levrek	22-24.08.2016
6	Muğla	Milas	Y-6	Levrek	22-24.08.2016
7	Muğla	Milas	Y-7	Levrek	22-24.08.2016
8	Muğla	Milas	Y-8	Levrek	22-24.08.2016
9	Muğla	Milas	Y-9	Levrek	22-24.08.2016
10	Mersin	Silifke	Y-10	Levrek	19.09.2016
11	Aydın	Didim	Y-11	Levrek	05.09.2016
12	Aydın	Didim	Y-12	Levrek	05.09.2016
13	Aydın	Didim	Y-13	Levrek	05.09.2016
14	İzmir	Dikili	Y-14	Levrek	06-07.09.2016
15	İzmir	Urla	Y-15	Levrek	06-07.09.2016
16	İzmir	Çeşme	Y-16	Levrek	06-07.09.2016
17	İzmir	Urla	Y-17	Levrek	06-07.09.2016
18	İzmir	Karaburun	Y-18	Levrek	06-07.09.2016
19	Muğla	Bodrum	Y-19	Levrek	22-24.08.2016
20	Muğla	Bodrum	Y-20	Levrek	22-24.08.2016
21	Muğla	Bodrum	Y-21	Levrek	22-24.08.2016
22	Antalya	Konyaaltı	Y-22	Levrek	20.09.2016
23	Adana	Karataş	Y-23	Levrek	20.09.2016
24	Hatay	İskenderun	Y-24	Levrek	20.09.2016

2.1.1.3. Retrospektif Epidemiyolojik Çalışma

VNN hastalığının ülkesel epidemiyolojisinin daha iyi ortaya konulması amacıyla virusun tespit edildiği kuluçkahane/yetiştirme işletmelerinde izleme, bağlantılı olduğu kuluçkahane/yetiştirme tarama çalışması ve retrospektif epidemiyolojik çalışma yapıldı. Bu amaçla belirlenen kuluçkahane/yetiştirme işletmelerinden tekrar örnekleme yapıldı, balıkların gelişme durumları gözönüne alınarak virusun hangi aşamada aktif olduğu ve olası bulaşma kaynakları belirlendi.

2.1.2. Hücre kültürü

Virus izolasyonunda OIE'nin VNN Referans Laboratuvarından (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Dipartimento di Ittiopatologia, Italy) temin edilen ve ulusal referans laboratuvarında stoklanan SSN-1 (Striped Snakehead) ve SSN-1'den klonu E-11 hücre hatları kullanıldı. Hücre hattı devamı ve virus izolasyonunda, % 1 antibiyotik (Sigma, USA, Product Number: A5955) ve % 5-10 fetal bovine serum (FBS) (Biowest, France, Cat. No: S181G-500) içeren Leibovitz-15 (L-15) (Gibco, USA, Ref: 11415-049) vasatı kullanıldı.

2.1.3. RNA Ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonu, ticari ekstraksiyon kiti (MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, Roche, Germany, Product No. 03038505001) ve otomatik ekstraksiyon cihazı (Roche MagNA Pure LC System) kullanılmak suretiyle yapıldı.

2.1.4. Kantitatif Real Time RT-PCR

VNN virusları RNA2 segmentinin T4 değişken bölgesinin filogenetik analizine göre dört genotipe (RGNNV, SJNNV, BFNNV, TPNNV) ayrılmaktadır ve bu bölgeye spesifik rtRT-PCR ile saptanabilmektedir. Çalışmanın Kantitatif Real

Time RT-PCR (qRT-PCR) testinde, VNN virusunun RNA2 segmentinin T4 değişken bölgesine göre dizayn edilen OIE (Anonim, 2014) tarafından da önerilen Panzarın ve ark. (2010), tarafından geliştirilen genetik dizilimdeki primer ve prob lar kullanıldı (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Real Time RT-PCR testinde kullanılan primer ve prob dizilimleri.

Primer	Hedef Bölge	Nt Pozisyonları	5' → 3' Dizilim	Amplikon Büyüklüğü (bp)	Referans Yayın
RNA2 Forward	RNA2	392–410	CAA-CTG-ACA-RCG-AHC-ACA-C	69	Panzarın ve ark., 2010
RNA2 Reverse		445–460	CCC-ACC-AYT-TGG-CVA-C		
RNA2 Prob		422–442	TYC-ARG-CRA-CTC-GTG-GTG-CVG*		

*Reporter; FAM, quencher; BHQ1

Kantitatif Real Time RT-PCR testinde ticari kit (Real Time Ready Virus Master, Roche, Germany, Cat. No. 05 992 877 01) ve Real Time RT-PCR cihazı (Roche LightCycler® 480 Multiwell Plate 96) kullanıldı.

2.1.5. cDNA Sentezi, PCR ve Dizi Analizi

Pozitif bulunan örneklerin hem uzun süre saklanması hem de dizi analizlerinin yapılabilmesi amacıyla RNA ekstraktlarından cDNA sentezi (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche, Germany, No. 04 379 012 001) yapıldı. Kısmi ve tüm genom dizi analizi amacıyla pozitif örnek cDNA'larından ticari kit (FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack Roche, Germany, Cat. No. 04 738 292 001) kullanılarak PCR yapıldı (Techne TC-412, United Kingdom). Kısmi ve tüm genom dizi analizleri için yapılan PCR'larda kullanılan primer dizilimleri Çizelge 2.5 ve 2.6'de gösterilmiştir.

Pozitif bulunan örneklerin öncelikle hangi genotipe ait olduğunun belirlenmesi amacıyla, virusun iki segmentine (RNA1 ve RNA-2) ayrı ayrı olarak kısmi dizileme yapıldı. Dizileme işlemleri ticari bir firmaya hizmet alımı yöntemiyle yaptırıldı. Gelen sonuçların düzeltme ve eşleştirme işlemleri DNADynamo programı ile yapıldı. Elde edilen sonuçlar, GenBank'ta yakın bulunan dizilimler ve virusun

tüm referans genotiplerinin dizilimleri ile MEGA6 programı ile eşleştirildi ve filogenetik analizleri yapıldı. Filogenetik analiz ile genotipi belirlenen örneklerden de virusun iki segmentine (RNA1 ve RNA-2) ayrı ayrı olarak tüm genom çalışmaları yapıldı.

Çizelge 2.5. Kısmi dizilemede kullanılan primerler ve ürün büyüklükleri.

No	Hedef Segment	Primer Adı	Primer Dizilimi (5' → 3')	Amplikon Büyüklüğü (bp)	Referans Yayın
1	RNA2	VNNV1 VNNV2	ACA CTG GAG TTT GAA ATT CA GTC TTG TTG AAG TTG TCC CA	605	Toffolo ve ark., 2007.
2	RNA1	VNNV5 VNNV8	GTT GAG GAT TAT CGC CAA CG CAG CAA CAC GGT AGT G	478	
3	RNA1	FOR521 VNNV6	ACG TGG ACA TGC ATG AGT TG ACC GGC GAA CAG TAT CTG AC	630	Bovo ve ark., 2011, Toffolo ve ark., 2007.

Çizelge 2.6. Tüm genom dizilemede kullanılan primerler ve ürün büyüklükleri (Panzarin ve ark., 2014).

No	Hedef Segment	Primer Adı	Primer Dizilimi (5' → 3')	Amplikon Büyüklüğü (bp)
1	RNA1	RNA1_283_5f RNA1_856_874r	TAA CAT CAC CTT CTT GCT GGT GCT CAC CCA TCT TGA	874
2		RNA1_684_705f RNA1_1346_1367r	GAA CTA CAA CCA GGA TAC CAT G GAC TCA CTT GGA AAT ACA	684
3		RNA1_1124_1145f RNA1_1955_1973r	ACA ATT TGT CAG ATA CTG TGA CAG CAG GTG CTT GG	849
4		RNA1_1750_1769f RNA1_2488_2507r	TCA ATG CCA ACG CAC ACA TTC ACC CAG AAT GGA ATG	758
5		RNA1_2200_2221f RNA1_RG_3r	GGC TTT GAC TTG AAG ATA CGA AGC GTA AGA CAG CA	903
1	RNA2	RNA2_283_5f RNA2_578_597r	TAA TCC ATC ACC GCT TTG GCT GCC AAC ACA CAG GA	593
2		VNNV1* VNNV2*	ACA CTG GAG TTT GAA ATT CA GTC TTG TTG AAG TTG TCC CA	605
3		RNA2_283_818_837f RNA2_1206_1227r	CAT TGA CTA CAA CCT TGG AG CAA TGG TAC CAA CAA TAG	424
4		RNA2_1041_1059f RNA2_283_3r	GGA AAA CTA ACC GGG TC CCG AGT TGA GAA GCG AT	399

*Toffolo ve ark., 2007

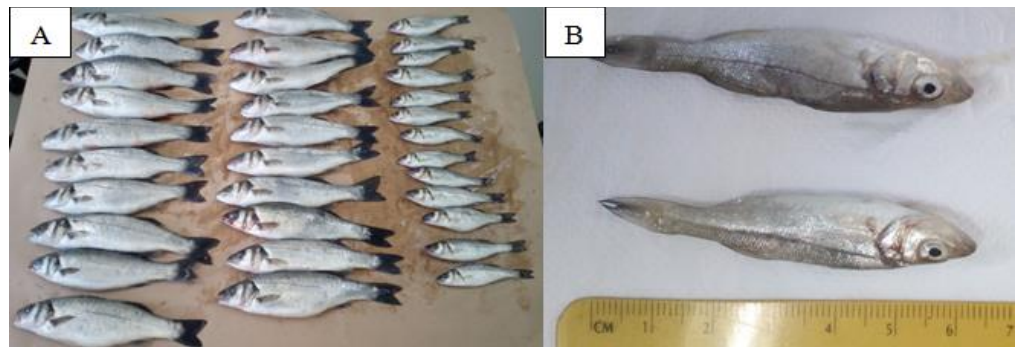
2.1.6. Pozitif Kontrol ve Plazmid

VNN OIE Referans Laboratuvarı (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Dipartimento di Ittiopatologia, Italy)'ndan temin edilen referans betanodavirus pozitif kontrol olarak kullanıldı. Plazmid klonlamada ticari kit kullanıldı (InsTAclone PCR Cloning Kit, #K1213, #K1214, Thermo Scientific, USA, Pub. No. MAN0012706).

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Hazırlanması

Kuluçkahane ve yetiştirme işletmelerinden sağlanan balık numunelerine ötanazi (Tricaine methane sulfonate (TMS, MS 222) 500 mg/L, Benzokain hydrklorit 250 mg/L) yapıldıktan sonra, bütün örnekler absorban kapasitesi olan kağıt ile silindikten sonra plastik örnek taşıma ambalajına yerleştirilip doğrudan kalın duvarlı strafor kutular içinde buz veya buz aküleri ile desteklenerek soğuk zincirde en geç 48 saat içerisinde laboratuvara ulaştırıldı. Herhangi bir pozitifliğin saptanması durumunda gerek örnek ile ilgili gerekse örneklerler arası bir korelasyonun olup olmadığının belirlenmesi amacıyla, gelen tüm örneklerin boy, ağırlık ve yaş bilgileri kaydedildi. Örnekler boy, ağırlık ve yaş özelliklerine göre gruplandırıldı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Levrek örneklerinin gruplandırılması. A: Y-16 Yetiştirme İşletmesi: büyük boy: 31 cm, 385 g; orta boy: 26 cm, 205 g; küçük boy: 15 cm, 45 g. B: K-14 Kuluçkahanesi: alt: 6 cm, 1,57 g; üst: 6,3 cm, 2,24 g.

Çalışmada laboratuvar ortamında aseptik şartlarda döllenmiş yumurta, prelarva, ve postlarva balıklar bütün olarak; fry balıklarda tüm kafa; fingerling ve daha büyük balıklarda ise beyin, spinal kord ve göz alındı (Şekil 2.2). Balıkların yaş, ağırlık ve boyları dikkate alınarak farklı sayıda balıktan bir grup/havuz oluşturuldu. Steril havanda pens ve makas yardımıyla parçalara ayrıldıktan sonra steril kum (Sea sand, Merck, Germany, CAS-No: 14808-60-7) ile ezilerek, % 2 FBS, % 1 antibiyotik içeren EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) (Sigma-Aldrich, United Kingdom, Product No: M4655) vasatı ile 1/10 oranında homojenize edildi. Homojenizatlar 15 ml hacimdeki steril santrifüj tüplerine (Sarstedt, Germany, Ref: 62.554.502) aktarıldıktan sonra +4 °C ve 3500 rpm'de santrifüj (ThermoFisher SL 16R, Germany) edildi ve elde edilen süpernatantlar 0.45 µm'lik membran filtreden (Sartorius, USA) geçirilerek inokulumlar hazırlandı. İnokulumlara ilgili kod numaraları yazılarak 2 ml'lik cryoviallere (CRYO.S, greiner bio-one, Germany, Ref: 122278) bölündü ve kullanılıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 2.2. Büyük boy balığa ait beyin ve omurilik.

2.2.2. Pozitif Kontrol ve Plazmid Klonlama

Real Time RT-PCR optimizasyonu ve çalışma testlerinde kullanılmak üzere referans betanodavirus plazmide klonlandı. Virusun RNA ekstraksiyonu yapıldı. RNA2 segmentinin T4 değişken bölgesi OIE Aquatic Manual (Anonim, 2014) tarafından önerilen metoda göre (Panzarin ve ark., 2010) 69 bp'lik kısmı amplifiye edilerek kit protkolüne uygun olarak plazmide klonlandı. Plazmid ekstraksiyonundan

sonra nanodrop cihazı ile DNA miktarı 90 ng/μl olarak belirlendi. Yapılan hesap neticesinde (Anonim, 2016) 2.82×10^{10} kopya/μl DNA konsantrasyonunda olduğu belirlendi.

2.2.3. RNA Ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonu, bölüm 2.1.3'te bildirilen ticari ekstraksiyon kiti kullanılarak otomatik ekstraksiyon cihazında yapıldı. Bu amaçla homojenizatlerden elde edilen süpernatantlardan 200'er μl alınarak 32 gözlü ekstraksiyon pleytlerine konuldu. RNA ekstraksiyonu ticari kitin protokölüne uygun olarak yapıldı. Ekstraksiyon işleminin doğrulanması ve olası çapraz kontaminasyonun tespit edilmesi amacıyla, her ekstraksiyon işleminde her ekstraksiyon pleytine pozitif kontrol ve negatif kontrol konuldu. Pozitif kontrol olarak referans betanodavirus, negatif kontrol olarak ise materyal hazırlama aşamasında kullanılan EMEM vasatı kullanıldı. Elde edilen ekstraktlar kullanılıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

2.2.4. Kantitatif Real Time RT-PCR Optimizasyonu

Balık hastalıkları Ulusal Referans Laboratuvarı olan İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü laboratuvarlarında VNN virusunun teşhisinde hali hazırda hücre kültüründe (SSN-1) virus izolasyonu ve devamında Nested PCR metodu kullanılmaktadır. Tez çalışmasının amaçlarından biri de OIE tarafından önerilen teşhis metodunun referans laboratuvar şartlarına optimize edilmesi ve rutin kullanımda yerini almasıdır. Bu amaçla, OIE (Anonim, 2014) tarafından önerilen, Panzarin ve ark. (2010), tarafından VNN virusunun RNA2 segmentinin T4 değişken bölgesine göre dizayn edilen primer ve probler kullanılarak geliştirilen kantitatif Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) metodunun optimizasyon çalışması yapıldı.

Optimizasyon kapsamında qRT-PCR metodunun lineer tespit aralığı, analitik sentitivite, spesifite ve tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmaları yapıldı. Standart eğrinin elde edilmesi ile qRT-PCR testinin sensitivite ve etkinliği

değerlendirildi. Optimizasyon çalışmalarında Bölüm 2.1.6’da bildirilen ve viral yükü tespit (Bölüm 2.2.2) edilen plazmid DNA’sı kullanıldı.

2.2.4.1. Mastermiks Bileşimi ve PCR Koşulları

VNN virusunun tespit edilmesi için yapılan Real Time RT-PCR işleminde ticari kit (Real Time Ready Virus Master, Roche, Cat. No. 05 992 877 01) ve Real Time PCR cihazı (Roche LyghtCycler ® 480 Multiwell Plate 96) kullanıldı. Mastermiks kit protokolüne göre hazırlandı (Çizelge 2.7).

Çizelge 2.7. qrtRT-PCR mastermiks hazırlamada kullanılan reagentlar ve miktarları.

Reagent	1 Örnek İçin (µl)
H ₂ O	9,1
F primer (10 pMol)	0,5
R primer (10 pMol)	0,5
Prob (10 pMol)	0,5
5x Buffer	4
Enzim	0,4
RNA miktarı	5
Toplam hacim	20

Buz üzerinde hazırlanan mastermiks, 96 gözlü Real Time PCR pleytlerine (Roche LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, White, Germany, Ref: 04 729 692 001) 15’er µl konulduktan sonra üzerlerine 5’er µl örnek, pozitif kontrol ve negatif kontrol eklendi. Pleyt üzeri şeffaf bant ile kapatıldıktan sonra 1500g’de +4 °C’de 2 dk santrifüj edildi ve PCR cihazının karoseline yerleştirildi. Çizelge 2.8’de bildirilen reaksiyon koşulları uygulanarak rtRT-PCR testi yapıldı ve sonuçlar cihaza bağlı bilgisayar ekranında değerlendirildi.

Çizelge 2.8. qrtRT-PCR reaksiyonu sıcaklık/süre koşulları ve döngü sayıları.

RT (1 Döngü)	Komplementer DNA'ya çevrilme	53°C	4 dakika
		50°C	6 dakika
	RT inhibisyonu	95°C	65 saniye
PCR (45 Döngü)	Ön Denatürasyon	95°C	10 saniye
	Bağlanma ve sentez	54°C	30 saniye
	Uzama	72°C	1 saniye

Pozitif örneklerdeki floresan ışıltama ve buna bağlı logaritmik artış bilgisayar ekranında görüntülendi. Bilgisayar programının hesaplamasıyla pozitif örneklerin Cycle threshold (Ct) değerleri okundu ve değerlendirildi.

2.2.4.2. Analitik Sensitivite ve Minimum Tespit Limiti

Plazmid DNA'sının 10 katlı seri sulandırılmaları, başlangıç viral yük oranı 10^6 , son dilüsyonu teorik olarak hiç viral yük içermeyecek şekilde 10^{-11} 'e kadar yapılarak her dilüsyondan üç kez konulmak suretiyle qrtRT-PCR yapıldı. Testin slope değeri, etkinliği, verimliliği ve R^2 değeri hesaplandı ve geçerlilikleri kontrol edildi. Sonuçlar analitik sensitivite ve minimum saptama limiti yönünden değerlendirildi. Dilüsyonlardan elde edilen Ct değerleri, plazmid DNA'sının viral yükü ile karşılaştırılarak hangi Ct değerinin hangi viral yükü tespit ettiği değerlendirildi.

2.2.4.3. Spesifite

Testin diğer balık virusları ile herhangi bir çapraz reaksiyon verip vermediğinin araştırılması amacıyla VNN virusu, İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis (IPN), Viral Hemorajik Septisemi (VHS) ve İnfeksiyöz Hematopoetik Nekrozis (IHN) virusları ve negatif kontrol aynı protokol ile test edilmiştir.

2.2.4.4. Tekrarlanabilirlik ve Tekrar Üretilirlik

Testin tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirliğinin belirlenmesi, aynı test içindeki ve testler arasındaki uyumun saptanması amacıyla değişim katsayıları (coefficient of variation-CV) değerlendirildi. Test içindeki uyumun belirlenmesi amacıyla düşük dilüsyondaki (10^{-8}), orta dilüsyondaki (10^{-5}) ve yüksek dilüsyondaki (10^{-2}) üç örnek ve her bir dilüsyon üç tekrarlı olarak iki kişi tarafından üç farklı günde çalışıldı.

2.2.5. Pozitif Örneklerde Viral Yük Tespiti

Çalışmada rtRT-PCR testi ile pozitif bulunan örneklerin viral yükleri, analitik sensitivitesi belirlenen kantitatif metotla elde edilen ve viral yükü bilinen standard dilüsyon ile aynı reaksiyonda amplifiye edilerek belirlendi. Bu amaçla, pozitif bulunan örnekler kopya miktarı bilinen plazmid DNA ile aynı reaksiyonda amplifiye edilerek bilgisayar programı yardımıyla viral yükleri hesaplandı. Viral yükler hücre kültüründe virus izolasyonu çalışmalarından önce ve sonra ayrı ayrı hesaplanarak aradaki farklar değerlendirildi.

2.2.6. Moleküler Çalışmalar

2.2.6.1. cDNA Sentezi

Pozitif bulunan RNA ekstraktları, filogenetik analizlerinin yapılması amacıyla, Bölüm 2.1.5'te bildirilen ticari kit ve cihaz kullanılarak cDNA'ya dönüştürüldü. cDNA sentezinde kullanılan reagentler ve reaksiyon koşulları Çizelge 2.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.9. cDNA sentezinde kullanılan reagentler ve reaksiyon koşulları.

Reagent	1 Örnek İçin (µl)	Reaksiyon Koşulları
Random Hexamer Primer, 00 pmol/µl	2	65°C 10 dakika Sonrasında buz üzerinde muhafaza
H ₂ O	3,5	
Örnek RNA	7,5	
Toplam Hacim	13	
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5× conc.	4	25°C 10 dakika 55°C 30 dakika
Protector RNase Inhibitor, 40 U/µl	0,5	
Deoxynucleotide Mix, 10 mM each	2	
Transcriptor Reverse Transcriptase, 20 U/µl	0,5	
Toplam hacim	20	

2.2.6.2. Kısmi Genom Dizileme ve Filogenetik Çalışmalar

Pozitif bulunan örneklerin tüm genom dizilemelerinin yapılabilmesi için gerekli olan genotiplendirme, kısmi dizileme ile yapıldı. cDNA'ya dönüştürülen pozitif örneklerin RNA1 ve RNA2 segmentlerini hedef alan kısmi dizilemeleri için, Çizelge 2.5'te bildirilen primer çiftleri kullanılarak PCR yapıldı. Kısmi ve tüm genom dizileme için yapılan PCR testleri çizelge 2.10'da bildirilen mastermiks bileşimi ve Çizelge 2.11'de belirtilen reaksiyon koşullarında gerçekleştirildi. Elde edilen amplikonlar DNA yükleme boyası (6x Loading Dye, Thermo Scientific, USA, R0611) ile muamele edilerek 0,5 µg/ml ethidium bromide (Nalgene Fisher Scientific, BP-1302-10, USA) içeren % 1,5'luk agaroz (Sigma, USA) jele aktarıldı. Ürün büyüklüğünün tespit edilebilmesi amacıyla ayrıca 100 bç'lik marker (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Litvanya, SM0241COMPONENTA) ilk tarak gözüne konuldu. Elektroforez işlemi 80 voltta 60 dakika sürdürüldü. Daha sonra agaroz jel, görüntüleme cihazında (Vilber Lourmat, EEC, France) incelendi. Çizelge 2.5'te bildirilen bç'lerde elde edilen bantlar pozitif olarak kabul edildi.

Çizelge 2.10. Kısmi ve tüm genom dizileme için yapılan PCR’da mastermiks bileşimi

Reagent	1 örnek için (µl)	Son Hacim
H ₂ O	34,5	
10x Buffer	5	1,8 mM MgCl ₂
dNTP miks	1	200 µM
Enzim	0,5	2,5 U
F primer (10 pMol)	2	0,4 µM
R primer (10 pMol)	2	0,4 µM
Örnek cDNA	5	
Toplam hacim	50	

Çizelge 2.11. Kısmi ve tüm genom dizileme için yapılan PCR’da reaksiyon ısı koşulları ve döngü sayıları.

1 Döngü	Ön Denatürasyon	95°C	2 dakika
45 Döngü	Denatürasyon	95°C	30 saniye
	Bağlanma ve sentez*	55°C	30 saniye
	Uzama	72°C	1 saniye
1 Döngü	Son Uzama	72°C	4 dakika

*RNA1 segmentinin tüm genom analizinde 1. ve 5. bölgeler için 50 °C kullanıldı

Pozitif örneklerin PCR’larından elde edilen ürünlerin, virusun RNA1 ve RNA2 segmentlerinin kısmi dizilemeleri ticari bir firmaya (Microsynt, Balgach, Switzerland) hizmet alımı yöntemiyle yaptırıldı. Gelen sonuçların düzeltme ve eşleştirme işlemleri DNADynamo programı ile gerçekleştirildi. Elde edilen konsensüs nükleotid dizileri National Central for Biotechnology Information (NCBI) (Altschul ve ark., 1990)’de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) sisteminde karşılaştırıldı ve doğrulandı. Tez çalışmasında elde edilen pozitif örneklerin filogenetik analizleri için izolatların RNA-1 ve RNA-2 kısmi nükleotid dizileri (Ek-3) ve genbanktan alınan referans dizilerinin (Ek-4, 5 ve 6) çoklu dizi hizalamaları MEGA6 programı kullanılarak ClustalW metodu ile gerçekleştirildi. Her iki segment için en iyi Protein/DNA modeli belirlenerek diziler arası nükleotid benzerlik oranları belirlendi. Komşu birleştirme (Neigbor-Joining-NJ) yöntemi ile 1000 tekrarlı önyüklem sekmesi (Bootstrap: 1000) seçildi ve filogenetik ağaçlar oluşturuldu (Tamura ve ark., 2013).

2.2.6.3. Tüm Genom Dizileme ve Filogenetik Çalışmalar

RNA1 ve RNA2 segmentlerinin kısmi nükleotid dizileri kullanılarak yapılan filogenetik çalışmalarla genotipleri belirlenen pozitif betanodavirus izolatlarının tüm genom dizileri, RNA1 ve RNA2 segmentlerinin tüm gen bölgelerini kapsayacak şekilde Çizelge 2.6'da bildirilen primer çiftleri kullanılarak Bölüm 2.2.6.2'de bildirilen reaksiyon koşulları ile amplifiye edildi. Amplifikasyonun Bölüm 2.2.6.2'de bildirilen görüntüleme yöntemleri ile doğrulanmasından sonra, ampikonların dizilemeleri ticari olarak aynı firmaya yaptırıldı. Gelen sonuçların düzeltme ve eşleştirme işlemleri DNADynamo programı ile gerçekleştirildi. Elde edilen konsensüs nükleotid dizileri NCBI (Altschul ve ark., 1990)'de BLAST sisteminde karşılaştırıldı ve doğrulandı.

Tez çalışmasında elde edilen pozitif örneklerin filogenetik analizleri için izolatların RNA-1 ve RNA-2 tüm genom nükleotid dizileri (Ek-3) ve genbanktan alınan referans dizilerinin (Ek-5 ve 6) çoklu dizi hizalamaları MEGA6 programı kullanılarak ClustalW metodu ile gerçekleştirildi. Filogenetik çalışmalarda izolatların UTR 5' ve 3' bölgeleri kesilerek, RNA1 için Protein A'nın kodlandığı tüm ORF; RNA2 için ise kapsid proteininin kodlandığı tüm ORF kullanıldı. En iyi Protein/DNA modeli belirlendikten sonra izolatlar ve referans izolatların benzerlik oranları belirlendi. NJ yöntemi ile 1000 tekrarlı önyükleme sekmesi (Bootstrap: 1000) seçildi ve filogenetik ağaçlar oluşturuldu (Tamura ve ark., 2013). Tüm genom nükleotid dizileri akdeniz havzasından elde edilen izolatlar ve dünyanın çeşitli bölgelerinden elde edilen izolatlar ile karşılaştırılarak nükleotid ve amino asit farklılıkları değerlendirildi.

2.2.7. Virus İzolasyonu

qRT-PCR ile pozitif bulunan ve moleküler çalışmalar ile genotiplendirmesi yapılan örneklerin hücre kültürlerinde izolasyon çalışması yapıldı. Sıvı azot tankında muhafaza edilen SSN-1/E11 hücre kültürleri 25 °C’de, % 5-10 FBS, % 1 antibiyotik-antimikotik içeren L-15 vasatı ile 25-75 cm²’lik flasklarda çözdürüldü. Yirmi beş °C’de monolayer hücre kültürü oluşması için 48-72 saat inkübe edildi. Çalışma hücre stoklarından virus izolasyon çalışmasında kullanılmak üzere 24 saatte % 85-90 monolayer olacak şekilde 24 gözlü hücre kültürü pleytleri hazırlandı.

Pozitif örneklerden SSN-1/E11 hücre kültürüne her bir gruptan 1/10 ve 1/100 dilüsyonunda inokülasyon yapıldı. Ayrıca, her hücre kültürü pleytinde 2 göz L-15 vasatı inoküle edilerek hücre kontrol, 2 göz de referans virus inoküle edilerek pozitif kontrol olarak bırakıldı. Bir saat 25 °C’de adsorbsiyona bırakıldı ve PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra, üzerine virus üretme vasatı (% 2 FBS, % 1 antibiyotik-antimikotik içeren L-15) ilave edildi. Kültür sistemleri 25 °C’de inkube edildi ve sitopatik etki yönünden 10 gün boyunca izlendi.

3. BULGULAR

3.1. Kantitatif Real Time RT-PCR Optimizasyonu

OIE tarafından önerilen Real time RT-PCR testinin, hem tez çalışmasında toplanan örneklerde virus tespitinde hem de balık hastalıkları ulusal referans laboratuvarında rutin teşhiste kullanılması amacıyla optimizasyon çalışması yapıldı. Bu kapsamda, testin analitik sensitivitesi, spesifitesi, minimum saptama limiti ve tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmaları yapıldı.

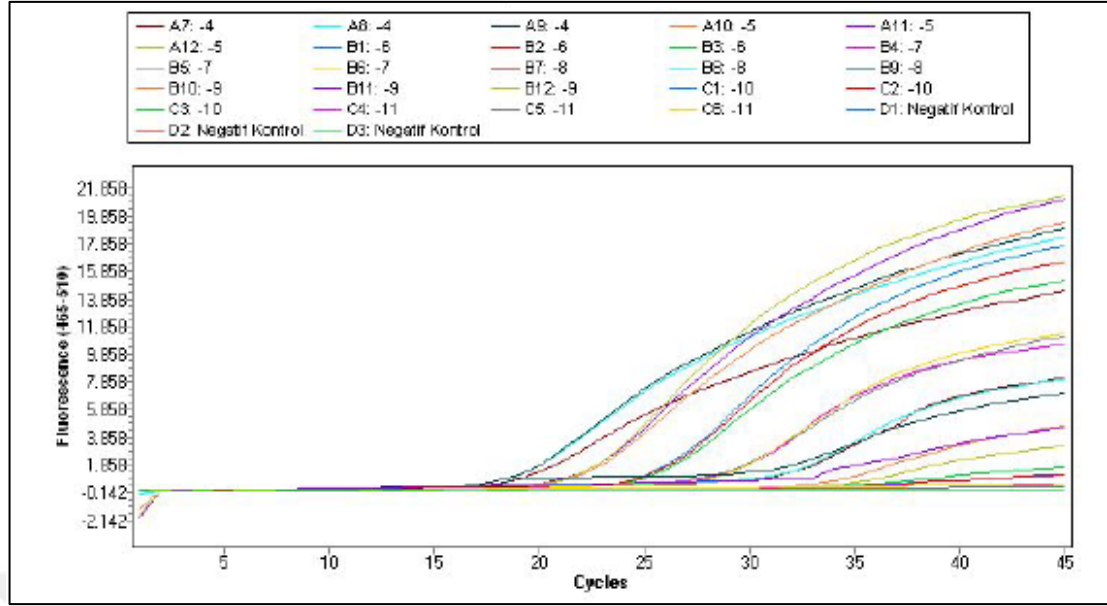
3.1.1. Analitik Sensitivite ve Minimum Tespit Limiti

OIE Aquatic Manual (Anonim, 2014) tarafından önerilen metoda göre rtRT-PCR testi yapıldı. Plazmid DNA'nın 10 katlı seri sulandırmaları, her dilüsyondan üç reaksiyon oluşturacak şekilde dizayn edilen qrtRT-PCR testi ile her dilüsyonun Ct değeri ve DNA kopya miktarı ile testin lineer teşhis aralığı ve minimum saptama limiti belirlendi (Şekil 3.1 ve 3.2). Lineer teşhis aralığının $2,82 (2,82 \times 10^0)$ - $2.800.000.000 (2,82 \times 10^{10})$ kopya/μl arasında olduğu belirlendi. Saptanabilen en düşük plazmid DNA dilüsyonu 10^{-10} olarak tespit edildi. Moleküler tanecik olarak hesaplandığında ise test ile en az $3 (3 \times 10^0)$ kopya/μl DNA içeren örneklerin tespit edilebildiği değerlendirildi. Hesaplanan 10^{-11} dilüsyonunda matematiksel olarak hiçbir DNA kopyasının kalmaması ve negatif olması gerektiği değerlendirildi. Optimizasyon testi ile bulunan sonuç, bu hipotez ile uyumlu bulundu ve negatif bulundu. Minimum tespit limiti ise 10^{-10} dilüsyon, yani $2,8 (2,8 \times 10^0)$ kopya/μl olarak belirlendi. Bu dilüsyonun Ct değerleri incelendiğinde; 34,68, 35,52 ve 34,84 olarak bulundu. Bu bilgilerin ışığında 35. Ct'ye kadar olan değerler pozitif, >35 Ct değerlerin ise negatif olarak değerlendirilmesi kanaatine varıldı (Şekil 3.1).

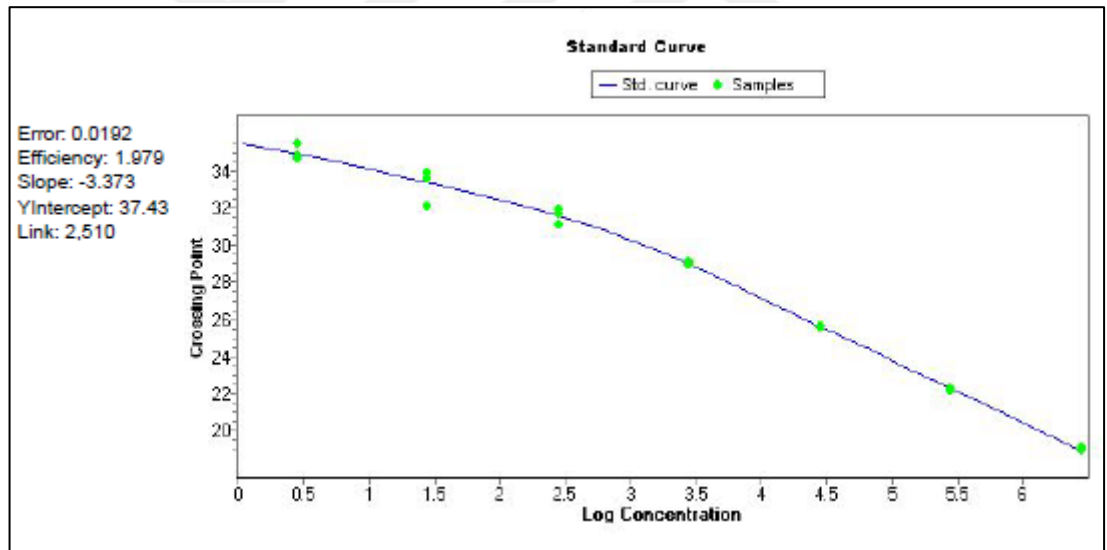
Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
☒	A7	-4	Standard	19.08	2.44E6	2.82E6	
☒	A8	-4	Standard	18.90	2.76E6	2.82E6	
☒	A9	-4	Standard	18.92	2.72E6	2.82E6	
☒	A10	-5	Standard	22.16	2.97E5	2.82E5	
☒	A11	-5	Standard	22.18	2.92E5	2.82E5	
☒	A12	-5	Standard	22.23	2.83E5	2.82E5	
☒	B1	-6	Standard	25.62	2.80E4	2.82E4	
☒	B2	-6	Standard	25.55	2.93E4	2.82E4	
☒	B3	-6	Standard	25.53	2.97E4	2.82E4	
☒	B4	-7	Standard	29.15	2.51E3	2.82E3	
☒	B5	-7	Standard	28.93	2.92E3	2.82E3	
☒	B6	-7	Standard	29.03	2.72E3	2.82E3	
☒	B7	-8	Standard	31.98	1.79E2	2.82E2	
☒	B8	-8	Standard	31.69	2.50E2	2.82E2	
☒	B9	-8	Standard	31.14	4.52E2	2.82E2	
☒	B10	-9	Standard	33.59	2.26E1	2.82E1	
☒	B11	-9	Standard	32.07	1.62E2	2.82E1	
☒	B12	-9	Standard	33.93	1.38E1	2.82E1	
☒	C1	-10	Standard	34.68	4.35E0	2.82E0	
☒	C2	-10	Standard	35.52	1.07E0	2.82E0	
☒	C3	-10	Standard	34.84	3.32E0	2.82E0	
☒	C4	-11	Negative Control				
☒	C5	-11	Negative Control				
☒	C6	-11	Negative Control				
☒	D1	Negatif Kontrol	Negative Control				
☒	D2	Negatif Kontrol	Negative Control				
☒	D3	Negatif Kontrol	Negative Control				

Şekil 3.1. Plazmid DNA'nın farklı sulandırılmalarının Ct değerleri ve kopya miktarları.

Nükleik asit konsantrasyonundaki azalmanın doğrusallık gösterdiği, testin verimliliği $E = (10^{-1/\text{slope}-1}) \times 100$ eşitliğinden $E = (10^{-1/-3.373-1}) \times 100 = \% 98$ olarak hesaplanarak belirlendi. Bu sonuç testin tekrarlanabilir ve sensitivitesinin yüksek olduğunu göstermektedir (Şekil 3.2 ve 3.3). Real Time PCR testlerinde iyi bir reaksiyonun verimliliğinin % 90 ile % 110 arasında (Broeders ve ark., 2014), slope değerinin ise -3,58 ile -3,1 arasında (Anonim, 2017c) olması gerektiği bildirilmiştir. Analitik çalışmada elde edilen slope değeri -3,373, verimlilik ise % 98 olarak bulunmuş olup, sonuçlar geçerli kabul edildi (Şekil 3.2, 3.3 ve Çizelge 3.2).



Şekil 3.2. Plazmid DNA'nın farklı sulandırılmalarının amplifikasyon eğrileri.



Şekil 3.3. Standart eğri.

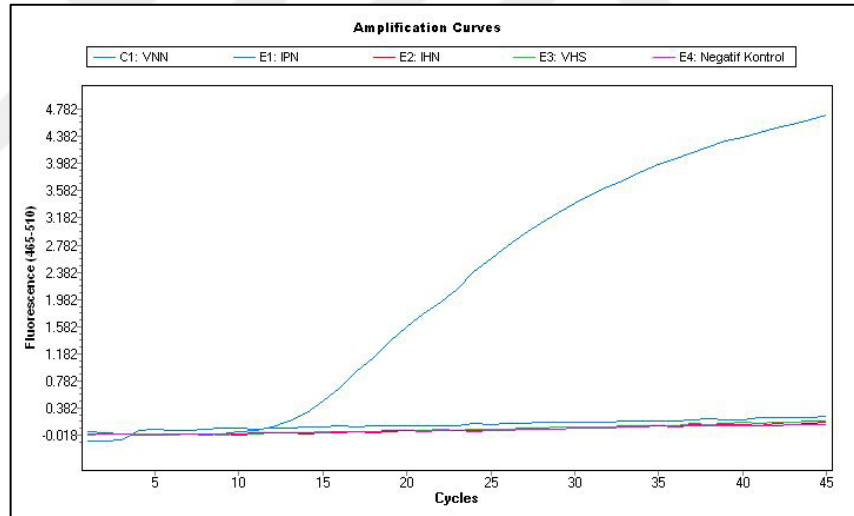
Plazmid DNA'nın 10^{-4} - 10^{-11} dilüsyonlarına ait Ct değerleri kullanılarak standart eğri oluşturuldu (Şekil 3.3). Real Time testlerinde standart eğrinin regresyon katsayısının (R^2) $\geq 0,98$ olması gerektiği bildirilmiştir (Broeders ve ark., 2014). Tez çalışmasında qrtRT-PCR testinde farklı dilüsyonların üç tekrarlı Ct sonuçlarına göre elde edilen verilerin R^2 değeri 0,98 olarak hesaplandı ve geçerli kabul edildi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Plazmid DNA'nın farklı dilüsyonlarının üç tekrarlı Ct sonuçlarına göre regresyon değerleri

Regresyon İstatistikleri	
Çoklu R	0,99
R Kare	0,98
Ayarlı R Kare	0,97
Standart Hata	0,90

3.1.2. Spesifite

qRT-PCR testinin diğer balık virusları ile herhangi bir çapraz reaksiyon verip vermediğinin araştırılması amacıyla VNN, IPN, VHS ve IHN virusları ve negatif kontrol aynı protokol ile test edilmiştir ve diğer balık viruslarında herhangi bir pozitiflik bulunmamıştır (Şekil 3.4).



Abs Quant/2nd Derivative Max for Secicilik (Abs Quant/2nd Derivative Max)						
Results						
Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard
☒	C1	VNN	Unknown	13.34		
☒	E1	IPN	Unknown			
☒	E2	IHN	Unknown			
☒	E3	VHS	Unknown			
☒	E4	Negatif Kontrol	Unknown			

Şekil 3.4. Optimize edilen qRT-PCR test metodunun spesifitesi.

Çizelge 3.2. qrtRT-PCR validasyon parametreleri ve sonuçları.

Validasyon Parametreleri	Kabul/Red Kriterleri	Hesaplamalar ve Sonuçlar
Seçicilik/ Spesifiklik	% 100	% 100
Verimlilik (Etkinlik)	≤ %90-110	% 98
Slope değeri	-3,58 - 3,1	-3,373
Regresyon katsayısı (R^2)	≥0,98	0,98
Yanlış Pozitif Cevap Oranı	% 0	% 0
Yanlış Negatif Cevap Oranı	% 0	% 0

3.1.3. Tekrarlanabilirlik ve Tekrar Üretilbilirlik

VNN virusunun T4 değişken bölgesinin amplifikasyonunda çalışmalar arası üretkenliği standart eğri döngüsünün üç kez tekrarlanması sonucu oluşan Ct değerlerinin ortalamaları alınarak bulundu. Her dilüsyonun üç tekrarından elde edilen Ct değerlerinin ortalamaları ve standart hataları hesaplanarak değişim katsayıları (CV) % olarak hesaplandı ve testin tekrarlanabilir olduğu görüldü (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. qrtRT-PCR testinin tekrarlanabilirlik verileri ve test içi parametrelerin değişim katsayıları.

Dilüsyon	1.tekrar	2.tekrar	3.tekrar	Ortalama	Standart Hata	Değişim Katsayısı (CV, %)
10^{-6}	19,08	18,9	18,92	18,97	0,08	0,42
10^{-5}	22,16	22,18	22,23	22,19	0,03	0,13
10^{-4}	25,62	25,55	25,53	25,57	0,04	0,15
10^{-3}	29,15	28,93	29,03	29,04	0,09	0,31
10^{-2}	31,98	31,69	31,14	31,60	0,35	1,10
10^{-1}	33,59	32,07	33,93	33,20	0,81	2,44
10^0	35,52	34,68	34,84	35,01	0,36	1,04

Üç farklı dilüsyonun (10^{-2} , 10^{-5} , 10^{-8}) farklı iki kişi tarafından üç farklı günde çalışıldığı testlerde, bilinen dilüsyonların sonuçları uyumlu bulundu. Test içi ve testler arası uyumun belirlenmesi için sorumlu ve yedek personel tarafından yapılan qrtRT-PCR sonuçlarına ilişkin elde edilen ortalama Ct değerleri ve değişim oranı (CV) yüzdeleri hesaplandı (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. qrtRT-PCR testinin tekrar üretilebilirlik sonuçları.

Test Tekrarı	Dilüsyon Oranı	Ct Değerleri		Ortalama Ct Değerleri		Standart Hata (Test içi)		CV (Test İçi)		Ct değerleri (Genel)	Standart Sapma (Genel)	CV (Genel)
		1.kişi	2.kişi	1.kişi	2.kişi	1.kişi	2.kişi	1.kişi	2.kişi			
1. Hafta		1.kişi	2.kişi	1.kişi	2.kişi	1.kişi	2.kişi	1.kişi	2.kişi			
	10 ⁻²	12,94	13									
	10 ⁻²	13,05	12,8	13,03	12,88	0,09	0,10	0,66	0,81	12,96	0,11	0,82
	10 ⁻²	13,11	12,85									
	10 ⁻⁵	22,11	22,34									
	10 ⁻⁵	22,16	22,19	22,17	22,27	0,06	0,08	0,27	0,34	22,22	0,07	0,33
	10 ⁻⁵	22,23	22,28									
	10 ⁻⁸	32,36	32,5									
	10 ⁻⁸	32,51	32,6	32,39	32,62	0,10	0,13	0,32	0,40	32,51	0,16	0,49
	10 ⁻⁸	32,31	32,76									
2. Hafta	10 ⁻²	14,15	14,27									
	10 ⁻²	14,01	13,9	14,03	14,05	0,12	0,19	0,83	1,39	14,04	0,02	0,12
	10 ⁻²	13,92	13,98									
	10 ⁻⁵	24,39	22,86									
	10 ⁻⁵	22,52	22,27	23,17	22,46	1,06	0,34	4,58	1,53	22,82	0,50	2,18
	10 ⁻⁵	22,59	22,26									
	10 ⁻⁸	32,05	31,63									
	10 ⁻⁸	32,2	31,9	32,01	31,76	0,21	0,14	0,65	0,43	31,89	0,18	0,55
	10 ⁻⁸	31,79	31,76									
3. Hafta	10 ⁻²	13,38	13,71									
	10 ⁻²	13,53	13,74	13,43	13,73	0,08	0,02	0,62	0,11	13,58	0,21	1,53
	10 ⁻²	13,39	13,73									
	10 ⁻⁵	22,16	21,91									
	10 ⁻⁵	22,18	21,9	22,19	21,90	0,04	0,01	0,16	0,03	22,05	0,20	0,92
	10 ⁻⁵	22,23	21,9									
	10 ⁻⁸	31,98	31,72									
	10 ⁻⁸	31,69	31,92	31,60	31,88	0,43	0,14	1,35	0,45	31,74	0,20	0,62
	10 ⁻⁸	31,14	32									
Genel											0,84	

Üç farklı günde yapılan testlerde hem test içi, hem testler arası uyumun belirlenmesi için değişim oranları hesaplandı. Test içi değişim oranları en az 0,03, en fazla 4,58; testler arası değişim oranları ise en az 0,12, en fazla 2,18; tüm testlerin ortalama değişim oranı ise 0,84 olarak bulundu.

3.2. Epidemiyolojik Veriler

Örneklerin toplanması sırasında gerçekleştirilen saha çalışmasında, levrek kuluçkahane ve yetiştirme işletmelerinden alınan anamnez bilgilerinde VNN hastalığına ilişkin olarak bir şüphe tecrübe edilmedi. Balıkların laboratuvar şartlarında testler için hazırlaması sırasında da eksternal ve internal olarak herhangi bir makroskopik patolojik bulguya rastlanmadı. Hem saha hem laboratuvar çalışmasında balıklar sağlıklı olarak değerlendirildi.

3.2.1. Levrek Kuluçkahanelerinde VNN Virusunun Varlığının Araştırılması

Tez çalışmasında 2016-2017 yıllarında faaliyette olan toplam 5 ile ait 16 adet kuluçkahaneden örnekleme yapıldı (Çizelge 3.5). Döllenmiş yumurta, prelarva, postlarva, fry ve fingerling boy levreklerden oluşan örneklem çerçevesinde, mevcut kuluçkahanelerin çalışma amaçlarına göre farklılık göstermekle birlikte 16 farklı kuluçkahanenin 8'inden döllenmiş yumurta (DY), 9'undan prelarva (PreL), 13'ünden postlarva (PostL), 13'ünden fry (Fry) ve 9'undan da fingerling üretim döneminden örnekleme gerçekleştirildi. Bazı kuluçkahanelerden aynı üretim dönemine ait farklı yaş gruplarından da örnekleme yapıldı.

Çizelge 3.5. Örneklenen kuluçkahaneler, örnek türleri, sayıları, örnekleme tarihleri ve test sonuçları.

Sıra No	İl	İlçe	İşletme Kodu	Tür	Yaş Grubu	Yaş (Gün)	Örnek Sayısı	Örnekleme Tarihi	Sonuç
1	İzmir	Dikili	K-17	Levrek	DY	1	30	13.12.2016	Negatif
2	İzmir	Dikili	K-17	Levrek	DY	1	30	13.12.2016	Negatif
3	İzmir	Dikili	K-17	Levrek	DY	2	30	13.12.2016	Negatif
4	İzmir	Dikili	K-17	Levrek	PreL	5	30	13.12.2016	Negatif
5	İzmir	Dikili	K-17	Levrek	PreL	5	30	13.12.2016	Negatif
6	İzmir	Dikili	K-17	Levrek	PreL	5	30	13.12.2016	Negatif
7	Aydın	Didim	K-2	Levrek	PostL	15	30	21.12.2016	Negatif
8	Aydın	Didim	K-2	Levrek	PostL	20	30	21.12.2016	Negatif

DY: Döllenmiş Yumurta; PreL: Prelarva; PostL: Post larva

Çizelge 3.5.Devam. Örneklenen kuluçkahaneler, örnek türleri, sayıları, örnekleme tarihleri ve test sonuçları.

Sıra No	İl	İlçe	İşletme Kodu	Tür	Yaş Grubu	Yaş (Gün)	Örnek Sayısı	Örnekleme Tarihi	Sonuç
9	Aydın	Didim	K-2	Levrek	PostL	25	30	21.12.2016	Negatif
10	Aydın	Didim	K-2	Levrek	PreL	4	30	21.12.2016	Negatif
11	İzmir	Çeşme	K-14	Levrek	DY	1	30	03.01.2017	Negatif
12	İzmir	Çeşme	K-14	Levrek	DY	1	30	03.01.2017	Negatif
13	İzmir	Çeşme	K-14	Levrek	DY	3	30	03.01.2017	Negatif
14	İzmir	Çeşme	K-14	Levrek	PreL	1	30	03.01.2017	Negatif
15	İzmir	Çeşme	K-14	Levrek	PreL	2	30	03.01.2017	Negatif
16	İzmir	Çeşme	K-14	Levrek	PreL	4	30	03.01.2017	Negatif
17	İzmir	Çeşme	K-14	Levrek	PostL	16	30	03.01.2017	Negatif
18	İzmir	Çeşme	K-14	Levrek	PostL	24	30	03.01.2017	Negatif
19	İzmir	Çeşme	K-14	Levrek	PostL	35	30	03.01.2017	Negatif
20	İzmir	Aliağa	K-12	Levrek	DY	1	30	04.01.2017	Negatif
21	İzmir	Aliağa	K-12	Levrek	DY	2	30	04.01.2017	Negatif
22	İzmir	Aliağa	K-12	Levrek	PreL	2	30	04.01.2017	Negatif
23	İzmir	Aliağa	K-12	Levrek	PreL	2	30	04.01.2017	Negatif
24	Muğla	Milas	K-9	Levrek	DY	1	30	13.02.2017	Negatif
25	Muğla	Milas	K-9	Levrek	PreL	6	30	13.02.2017	Negatif
26	Muğla	Milas	K-9	Levrek	PostL	14	30	13.02.2017	Negatif
27	Muğla	Milas	K-9	Levrek	Fry	75	10	13.02.2017	Negatif
28	Muğla	Milas	K-9	Levrek	Fry	75	10	13.02.2017	Negatif
29	Muğla	Milas	K-9	Levrek	Fry	75	10	13.02.2017	Negatif
30	Muğla	Milas	K-9	Levrek	Fingerling	110	10	13.02.2017	Negatif
31	Muğla	Milas	K-9	Levrek	Fingerling	110	10	13.02.2017	Negatif
32	Muğla	Milas	K-9	Levrek	Fingerling	110	10	13.02.2017	Negatif
33	Muğla	Milas	K-6	Levrek	DY	1	30	13.02.2017	Negatif
34	Muğla	Milas	K-6	Levrek	PreL	3	30	13.02.2017	Negatif
35	Muğla	Milas	K-6	Levrek	PostL	37	30	13.02.2017	Negatif
36	Çanakkale	Lapseki	K-18	Levrek	DY	1	30	15.02.2017	Negatif
37	Çanakkale	Lapseki	K-18	Levrek	PreL	2	30	15.02.2017	Negatif
38	Çanakkale	Lapseki	K-18	Levrek	PostL	30	30	15.02.2017	Negatif
39	İzmir	Çeşme	K-14	Levrek	Fry	42	15	07.03.2017	Negatif
40	İzmir	Çeşme	K-14	Levrek	Fry	49	15	07.03.2017	Negatif
41	İzmir	Çeşme	K-14	Levrek	Fingerling	130	10	07.03.2017	Negatif
42	İzmir	Çeşme	K-14	Levrek	Fingerling	130	10	07.03.2017	Negatif
43	İzmir	Çeşme	K-14	Levrek	Fingerling	130	10	07.03.2017	Negatif

DY: Dölllenmiş Yumurta; PreL: Prelarva; PostL: Post larva

Çizelge 3.5.Devam. Örneklenen kuluçkahaneler, örnek türleri, sayıları, örnekleme tarihleri ve test sonuçları

Sıra No	İl	İlçe	İşletme Kodu	Tür	Yaş Grubu	Yaş (Gün)	Örnek Sayısı	Örnekleme Tarihi	Sonuç
44	İzmir	Dikili	K-13	Levrek	DY	1	30	16.03.2017	Negatif
45	İzmir	Dikili	K-13	Levrek	PreL	4	30	16.03.2017	Negatif
46	İzmir	Dikili	K-13	Levrek	PostL	25	15	16.03.2017	Negatif
47	İzmir	Dikili	K-13	Levrek	PostL	35	15	16.03.2017	Negatif
48	İzmir	Dikili	K-13	Levrek	Fry	59	10	16.03.2017	Negatif
49	İzmir	Dikili	K-13	Levrek	Fry	59	10	16.03.2017	Negatif
50	İzmir	Dikili	K-13	Levrek	Fry	59	10	16.03.2017	Negatif
51	İzmir	Dikili	K-13	Levrek	Fry	73	10	16.03.2017	Negatif
52	İzmir	Dikili	K-13	Levrek	Fry	73	10	16.03.2017	Negatif
53	İzmir	Dikili	K-13	Levrek	Fry	73	10	16.03.2017	Negatif
54	Muğla	Milas	K-11	Levrek	PostL	28	30	28.03.2017	Negatif
55	Muğla	Milas	K-8	Levrek	DY	1	30	28.03.2017	Negatif
56	Muğla	Milas	K-8	Levrek	DY	1	30	28.03.2017	Negatif
57	Muğla	Milas	K-8	Levrek	DY	1	30	28.03.2017	Negatif
58	Muğla	Milas	K-8	Levrek	PostL	35	15	28.03.2017	Negatif
59	Muğla	Milas	K-8	Levrek	PostL	35	15	28.03.2017	Negatif
60	Muğla	Milas	K-8	Levrek	Fry	75	10	28.03.2017	Negatif
61	Muğla	Milas	K-8	Levrek	Fry	75	10	28.03.2017	Negatif
62	Muğla	Milas	K-8	Levrek	Fry	75	10	28.03.2017	Negatif
63	Muğla	Milas	K-6	Levrek	Fry	79	10	28.03.2017	Negatif
64	Muğla	Milas	K-6	Levrek	Fry	79	10	28.03.2017	Negatif
65	Muğla	Milas	K-6	Levrek	Fry	79	10	28.03.2017	Negatif
66	Muğla	Milas	K-6	Levrek	Fingerling	92	10	28.03.2017	Negatif
67	Muğla	Milas	K-6	Levrek	Fingerling	92	10	28.03.2017	Negatif
68	Muğla	Milas	K-6	Levrek	Fingerling	92	10	28.03.2017	Negatif
69	Muğla	Milas	K-10	Levrek	PostL	40	15	28.03.2017	Negatif
70	Muğla	Milas	K-10	Levrek	PostL	40	15	28.03.2017	Negatif
71	Muğla	Milas	K-10	Levrek	Fry	120	10	28.03.2017	Negatif
72	Muğla	Milas	K-10	Levrek	Fry	120	10	28.03.2017	Negatif
73	Muğla	Milas	K-10	Levrek	Fry	120	10	28.03.2017	Negatif
74	Muğla	Milas	K-10	Levrek	Fingerling	140	10	28.03.2017	Negatif
75	Muğla	Milas	K-10	Levrek	Fingerling	140	10	28.03.2017	Negatif
76	Muğla	Milas	K-10	Levrek	Fingerling	140	10	28.03.2017	Negatif
77	İzmir	Dikili	K-17	Levrek	PostL	23	30	12.04.2017	Negatif
78	İzmir	Dikili	K-17	Levrek	Fry	53	30	12.04.2017	Negatif

DY: Dölllenmiş Yumurta; PreL: Prelarva; PostL: Post larva

Çizelge 3.5.Devam. Örneklenen kuluçkahaneler, örnek türleri, sayıları, örnekleme tarihleri ve test sonuçları

Sıra No	İl	İlçe	İşletme Kodu	Tür	Yaş Grubu	Yaş (Gün)	Örnek Sayısı	Örnekleme Tarihi	Sonuç
79	İzmir	Dikili	K-17	Levrek	Fry	64	30	12.04.2017	Negatif
80	İzmir	Dikili	K-17	Levrek	Fry	73	30	12.04.2017	Negatif
81	İzmir	Çeşme	K-15	Levrek	Fry	56	30	24.04.2017	Negatif
82	İzmir	Çeşme	K-15	Levrek	Fry	60	30	24.04.2017	Negatif
83	İzmir	Çeşme	K-15	Levrek	Fry	70	30	24.04.2017	Negatif
84	İzmir	Çeşme	K-15	Levrek	Fingerling	96	10	24.04.2017	Negatif
85	İzmir	Çeşme	K-15	Levrek	Fingerling	96	10	24.04.2017	Negatif
86	İzmir	Çeşme	K-15	Levrek	Fingerling	96	10	24.04.2017	Negatif
87	İzmir	Çeşme	K-15	Levrek	Fingerling	104	10	24.04.2017	Negatif
88	İzmir	Çeşme	K-15	Levrek	Fingerling	104	10	24.04.2017	Negatif
89	İzmir	Çeşme	K-15	Levrek	Fingerling	104	10	24.04.2017	Negatif
90	İzmir	Çeşme	K-15	Levrek	Fingerling	125	10	24.04.2017	Negatif
91	İzmir	Çeşme	K-15	Levrek	Fingerling	125	10	24.04.2017	Negatif
92	İzmir	Çeşme	K-15	Levrek	Fingerling	125	10	24.04.2017	Negatif
93	Adana	Karataş	K-1	Levrek	PostL	15	30	08.05.2017	Negatif
94	Adana	Karataş	K-1	Levrek	Fry	70	10	08.05.2017	Negatif
95	Adana	Karataş	K-1	Levrek	Fry	70	10	08.05.2017	Negatif
96	Adana	Karataş	K-1	Levrek	Fry	70	10	08.05.2017	Negatif
97	Adana	Karataş	K-1	Levrek	Fingerling	115	10	08.05.2017	Pozitif
98	Adana	Karataş	K-1	Levrek	Fingerling	115	10	08.05.2017	Pozitif
99	Adana	Karataş	K-1	Levrek	Fingerling	115	10	08.05.2017	Pozitif
100	Aydın	Didim	K-4	Levrek	PostL	37	15	31.05.2017	Negatif
101	Aydın	Didim	K-4	Levrek	PostL	37	15	31.05.2017	Negatif
102	Aydın	Didim	K-4	Levrek	Fry	65	15	31.05.2017	Negatif
103	Aydın	Didim	K-4	Levrek	Fry	65	15	31.05.2017	Negatif
104	Aydın	Didim	K-4	Levrek	Fingerling	93	10	31.05.2017	Negatif
105	Aydın	Didim	K-4	Levrek	Fingerling	93	10	31.05.2017	Negatif
106	Aydın	Didim	K-4	Levrek	Fingerling	93	10	31.05.2017	Negatif
107	Aydın	Söke	K-3	Levrek	PreL	3	30	31.05.2017	Negatif
108	Aydın	Söke	K-3	Levrek	PostL	27	30	31.05.2017	Negatif
109	Aydın	Söke	K-3	Levrek	Fry	68	10	31.05.2017	Negatif
110	Aydın	Söke	K-3	Levrek	Fry	68	10	31.05.2017	Negatif
111	Aydın	Söke	K-3	Levrek	Fry	68	10	31.05.2017	Negatif
112	Aydın	Söke	K-3	Levrek	Fingerling	117	10	31.05.2017	Negatif
113	Aydın	Söke	K-3	Levrek	Fingerling	117	10	31.05.2017	Negatif

DY: Dölllenmiş Yumurta; PreL: Prelarva; PostL: Post larva

Çizelge 3.5.Devam. Örneklenen kuluçkahaneler, örnek türleri, sayıları, örnekleme tarihleri ve test sonuçları

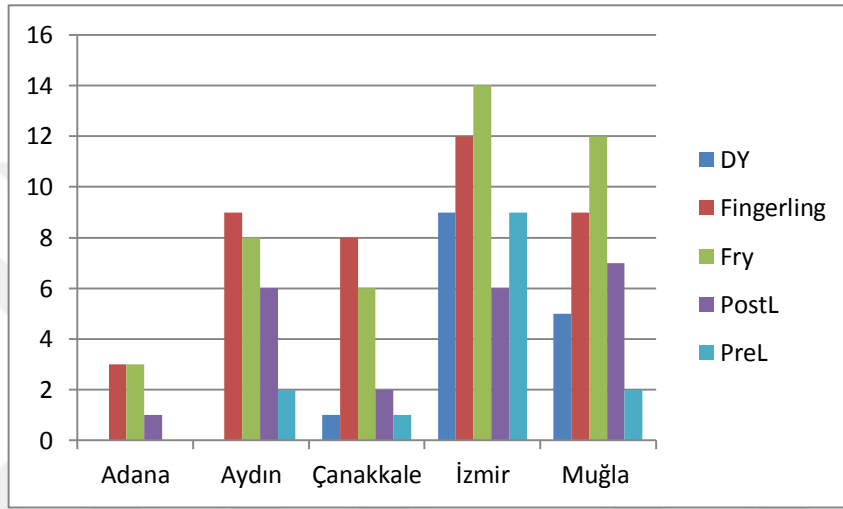
Sıra No	İl	İlçe	İşletme Kodu	Tür	Yaş Grubu	Yaş (Gün)	Örnek Sayısı	Örnekleme Tarihi	Sonuç
114	Aydın	Söke	K-3	Levrek	Fingerling	117	10	31.05.2017	Negatif
115	Çanakkale	Lapseki	K-18	Levrek	PostL	45	30	06.06.2017	Negatif
116	Çanakkale	Lapseki	K-18	Levrek	Fry	63	15	31.07.2017	Negatif
117	Çanakkale	Lapseki	K-18	Levrek	Fry	63	15	31.07.2017	Negatif
118	Çanakkale	Lapseki	K-18	Levrek	Fry	63	15	31.07.2017	Negatif
119	Çanakkale	Lapseki	K-18	Levrek	Fry	63	15	31.07.2017	Negatif
120	Çanakkale	Lapseki	K-18	Levrek	Fry	68	15	31.07.2017	Negatif
121	Çanakkale	Lapseki	K-18	Levrek	Fry	68	15	31.07.2017	Negatif
122	Çanakkale	Lapseki	K-18	Levrek	Fingerling	80	15	31.07.2017	Negatif
123	Çanakkale	Lapseki	K-18	Levrek	Fingerling	80	15	31.07.2017	Negatif
124	Çanakkale	Lapseki	K-18	Levrek	Fingerling	100	10	31.07.2017	Negatif
125	Çanakkale	Lapseki	K-18	Levrek	Fingerling	100	10	31.07.2017	Negatif
126	Çanakkale	Lapseki	K-18	Levrek	Fingerling	100	10	31.07.2017	Negatif
127	Çanakkale	Lapseki	K-18	Levrek	Fingerling	120	10	31.07.2017	Negatif
128	Çanakkale	Lapseki	K-18	Levrek	Fingerling	120	10	31.07.2017	Negatif
129	Çanakkale	Lapseki	K-18	Levrek	Fingerling	120	10	31.07.2017	Negatif
130	Aydın	Didim	K-5	Levrek	Fingerling	115	30	02.08.2017	Negatif
131	Aydın	Didim	K-5	Levrek	Fingerling	95	15	02.08.2017	Negatif
132	Aydın	Didim	K-5	Levrek	Fingerling	95	15	02.08.2017	Negatif
133	Aydın	Didim	K-2	Levrek	Fry	59	10	02.08.2017	Negatif
134	Aydın	Didim	K-2	Levrek	Fry	59	10	02.08.2017	Negatif
135	Aydın	Didim	K-2	Levrek	Fry	59	10	02.08.2017	Negatif
Toplam					135 Grup		2460 Örnek		

DY: Dölllenmiş Yumurta; PreL: Prelarva; PostL: Post larva

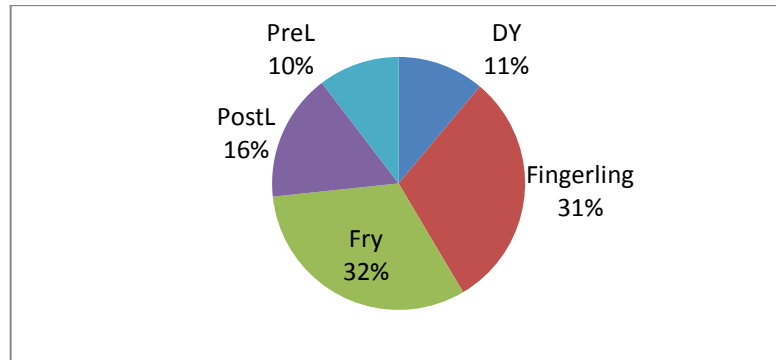
Tüm kuluçkahanelerden sağlanan farklı yaş grubundaki toplam 2460 adet yavru levrek örneğinden 135 çalışma grubu oluşturuldu. Yaş dönemleri değerlendirildiğinde, 15 grup döllenmiş yumurta, 14 grup prelarva, 22 grup postlarva, 43 grup fry, 41 grup fingerling boy balıktan virus araştırması yapıldı (Çizelge 3.6., Şekil 3.5). Örneklenen yavru levreklerin yaş gruplarına göre dağılımları Şekil 3.6’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Yavru levrek örneklerinin yaş gruplarına göre iller bazında dağılımı.

İller	DY	PreL	PostL	Fry	Fingerling	Toplam
Adana	-	-	1	3	3	7
Aydın	-	2	6	8	9	25
Çanakkale	1	1	2	6	8	18
İzmir	9	9	6	14	12	50
Muğla	5	2	7	12	9	35
Toplam	15	14	22	43	41	135



Şekil 3.5. Yavru levrek örneklerinin yaş gruplarına göre iller bazında dağılımı.

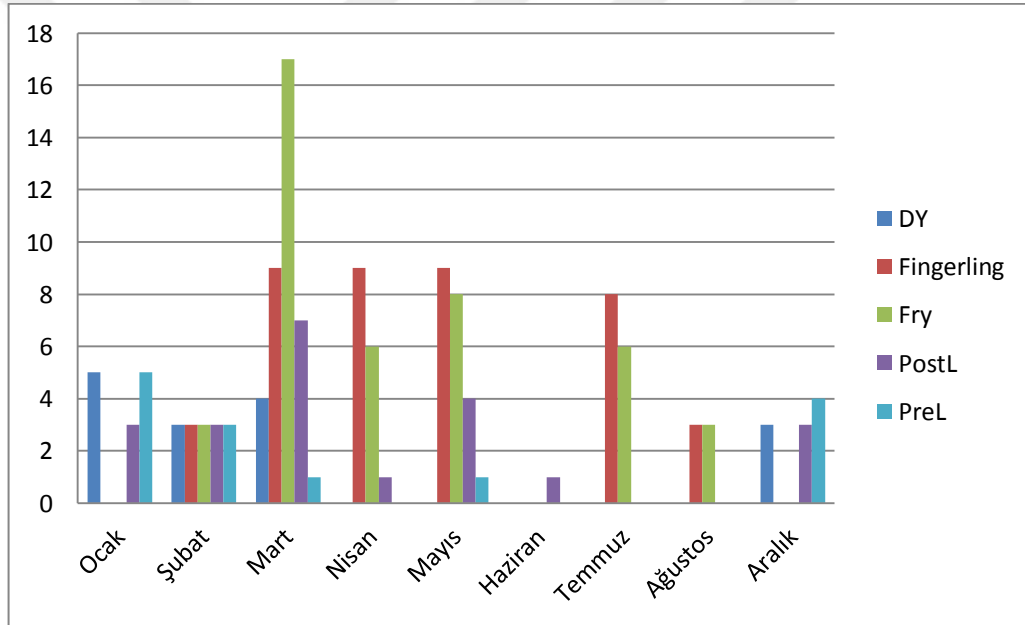


Şekil 3.6. Yavru levrek örneklerinin yaş gruplarına göre yüzdelik dağılımları.

Örnekleme mevsimsel dağılımları incelendiğinde 38 grup Aralık-Ocak-Şubat aylarında; 76 grup Mart-Nisan-Mayıs aylarında, 21 grup ise Haziran-Temmuz ve Ağustos aylarında örneklendi (Çizelge 3.7). Yavru levreklerin yaş gruplarına göre örnekleme zamanları Şekil 3.7’te gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Yavru levrek örneklerinin yaş gruplarına göre aylar bazında örnekleme sayıları.

Aylar	DY	PreL	PostL	Fry	Fingerling	Toplam
Ocak	5	5	3	-	-	13
Şubat	3	3	3	3	3	15
Mart	4	1	7	17	9	38
Nisan	-	-	1	6	9	16
Mayıs	-	1	4	8	9	22
Haziran	-	-	1	-	-	1
Temmuz	-	-	-	6	8	14
Ağustos	-	-	-	3	3	6
Aralık	3	4	3	-	-	10
Toplam	15	14	22	43	41	135



Şekil 3.7. Yavru levrek örneklerinin yaş gruplarına göre aylar bazında örnekleme sayıları.

Örneklemlerin yapıldığı kuluçkahanelerde güncel su ısıları, döllenmiş yumurta tanklarında 15 °C, prelarva tanklarında 15-16 °C, postlarva tanklarında 16-20 °C, fry tanklarında 16-22 °C, fingerling tanklarında ise 20-24 °C olarak ölçüldü.

qRT-PCR testleri sonucunda 16 kuluçkahaneden (Çizelge 2.2), sadece K-1 kuluçkahanesinde 115 günlük fingerling boy levreklerde VNN virusu tespit edildi (Çizelge 3.5). İleride yapılacak çalışmalarda ve genbankta kullanılmak amacıyla,

elde edilen betanodavirus izolatına TR.VNN.01.02 adı verildi. K-1 kuluçkahanesi Mayıs ayında deniz suyu ısısının yükselmeye başladığı zamanda örneklendi ve aynı dönemde alınan postlarva ve fry boy balıklarda virus tespit edilmedi. Kuluçkahane ile ilgili elde edilen bilgilerde, tesisin kapalı sistem olduğu, biyogüvenlik önlemlerini uyguladığı, denizden sağlanan suyun filtrelerden geçirildiği, ozon ve UV ile sterilizasyonunun yapıldığı, ayrıca kuluçkahanede sadece 1,5-2 g'dan büyük olan fingerling levreklerin dış sisteme alındığı ve işleme tabi tutulmayan deniz suyunun kullanıldığı bilgisi alındı.

Prevalansın belirlenmesinde, kuluçkahanelerde yetiştirilen yavru levreklerin yaş gruplarına bakılmaksızın, virusun herhangi bir yaş grubunda tespit edildiği kuluçkahane mihrak olarak değerlendirildi. Epidemiyolojik ünite seçiminde, VNN virusunun ülke genelindeki durumunun ortaya konulması amaçlandığından ülkenin tamamı bir ünite, kuluçkahaneler ise alt ünite olarak değerlendirildi. Bu değerlendirme ile 16 kuluçkahaneden 1 tanesinde virus tespit edildiğinden, Türkiye genelinde kuluçkahane bazında betanodavirus prevalansı % 6,25 (1/16) olarak hesaplandı.

3.2.2. Levrek Yetiştirme İşletmelerinde VNN Virusunun Varlığının Araştırılması

Tez çalışmasında Türkiye’de faaliyet gösteren 418 adet levrek yetiştirme işletmesinden epidemiyolojik temelli hesaplamayla toplam 7 ile ait 24 adet işletmeden örnekleme yapıldı (Çizelge 3.8). Rasgele örnekleme stratejisinde, işletmelerde halihazırda yetiştirilen tüm levrek yaş gruplarının örneklenmesi sağlandı. Buna göre işletmelerdeki kodlamalar, gelen her örneğin uzunluk ve ağırlıkları ölçülmek suretiyle küçük, orta ve büyük olmak üzere üç yaş grubuna ayrıldı. Levreklerin uzunlukları 5,5 - 45 cm arasında, ağırlıkları ise 3,2 - 950 g arasında ölçüldü. Toplam 720 adet levrek örneğinden 80 çalışma grubu oluşturuldu.

Çizelge 3.8. Örneklenen levrek yetiştirme işletmeleri, örnek sayıları, örnekleme tarihleri ve test sonuçları.

Sıra No	İl	İlçe	İşletme Kodu	Örnek	Örnek Sayısı	İşletmeden Alınan Toplam Örnek Sayısı	Örnekleme Tarihi	Sonuç
1	Muğla	Milas	Y-1	Büyük-1	5	30	23.08.2016	Negatif
2	Muğla	Milas	Y-1	Büyük-2	5			Negatif
3	Muğla	Milas	Y-1	Orta	10			Negatif
4	Muğla	Milas	Y-1	Küçük	10			Negatif
5	Muğla	Milas	Y-1	Göz	10			Negatif
6	Muğla	Milas	Y-2	Büyük	10	30	23.08.2016	Negatif
7	Muğla	Milas	Y-2	Orta	10			Negatif
8	Muğla	Milas	Y-2	Küçük	10			Negatif
9	Muğla	Milas	Y-3	Büyük	10	30	23.08.2016	Negatif
10	Muğla	Milas	Y-3	Orta	10			Negatif
11	Muğla	Milas	Y-3	Küçük	10			Negatif
12	Muğla	Milas	Y-4	Büyük	10	30	23.08.2016	Negatif
13	Muğla	Milas	Y-4	Orta	10			Negatif
14	Muğla	Milas	Y-4	Küçük	10			Negatif
15	Muğla	Milas	Y-5	Büyük-1	10	30	23.08.2016	Negatif
16	Muğla	Milas	Y-5	Büyük-2	10			Negatif
17	Muğla	Milas	Y-5	Büyük-3	10			Negatif
18	Muğla	Milas	Y-6	Büyük	10	30	23.08.2016	Negatif
19	Muğla	Milas	Y-6	Orta	10			Negatif
20	Muğla	Milas	Y-6	Küçük	10			Negatif
21	Muğla	Milas	Y-7	Büyük-1	5	30	23.08.2016	Negatif
22	Muğla	Milas	Y-7	Büyük-2	5			Negatif
23	Muğla	Milas	Y-7	Orta-1	5			Negatif
24	Muğla	Milas	Y-7	Orta-2	5			Negatif
25	Muğla	Milas	Y-7	Küçük	10			Negatif
26	Muğla	Milas	Y-8	Büyük	10	30	23.08.2016	Negatif
27	Muğla	Milas	Y-8	Orta	10			Negatif
28	Muğla	Milas	Y-8	Küçük	10			Negatif
29	Muğla	Milas	Y-9	Büyük-1	5	30	23.08.2016	Negatif
30	Muğla	Milas	Y-9	Büyük-2	5			Negatif
31	Muğla	Milas	Y-9	Orta	10			Negatif
32	Muğla	Milas	Y-9	Küçük	10			Negatif
33	Mersin	Silifke	Y-10	Büyük	10	30	24.08.2016	Negatif
34	Mersin	Silifke	Y-10	Orta	10			Negatif
35	Mersin	Silifke	Y-10	Küçük	10			Negatif

Çizelge 3.8.Devam. Örneklenen levrek yetiştirme işletmeleri, örnek sayıları, örnekleme tarihleri ve test sonuçları.

Sıra No	İl	İlçe	İşletme Kodu	Örnek	Örnek Sayısı	İşletmeden Alınan Toplam Örnek Sayısı	Örnekleme Tarihi	Sonuç
36	Aydın	Didim	Y-11	Büyük-1	5	30	05.09.2016	Negatif
37	Aydın	Didim	Y-11	Büyük-2	5			Negatif
38	Aydın	Didim	Y-11	Büyük-3	10			Negatif
39	Aydın	Didim	Y-11	Büyük-4	10			Negatif
40	Aydın	Didim	Y-12	Orta-1	10	30	05.09.2016	Negatif
41	Aydın	Didim	Y-12	Orta-2	10			Negatif
42	Aydın	Didim	Y-12	Orta-3	10			Negatif
43	Aydın	Didim	Y-13	Küçük-1	10	30	05.09.2016	Negatif
44	Aydın	Didim	Y-13	Küçük-2	10			Negatif
45	Aydın	Didim	Y-13	Küçük-3	10			Negatif
46	İzmir	Dikili	Y-14	Büyük	10	30	06.09.2016	Negatif
47	İzmir	Dikili	Y-14	Orta	10			Negatif
48	İzmir	Dikili	Y-14	Küçük	10			Negatif
49	İzmir	Urla	Y-15	Büyük-1	10	30	06.09.2016	Negatif
50	İzmir	Urla	Y-15	Büyük-2	10			Negatif
51	İzmir	Urla	Y-15	Büyük-3	10			Negatif
52	İzmir	Çeşme	Y-16	Büyük	10	30	07.09.2016	Negatif
53	İzmir	Çeşme	Y-16	Orta	10			Negatif
54	İzmir	Çeşme	Y-16	Küçük	10			Negatif
55	İzmir	Urla	Y-17	Büyük	10	30	07.09.2016	Negatif
56	İzmir	Urla	Y-17	Orta	10			Negatif
57	İzmir	Urla	Y-17	Küçük	10			Negatif
58	İzmir	Karaburun	Y-18	Büyük-1	10	30	07.09.2016	Negatif
59	İzmir	Karaburun	Y-18	Küçük-1	10			Negatif
60	İzmir	Karaburun	Y-18	Küçük-2	10			Negatif
61	Muğla	Bodrum	Y-19	Orta	10	30	06.09.2016	Negatif
62	Muğla	Bodrum	Y-19	Orta	10		27.09.2016	Negatif
63	Muğla	Bodrum	Y-19	Büyük-1	5			Negatif
64	Muğla	Bodrum	Y-19	Büyük-2	5			Negatif
65	Muğla	Bodrum	Y-20	Büyük	5	30	06.09.2016	Negatif
66	Muğla	Bodrum	Y-20	Büyük	5			Negatif
67	Muğla	Bodrum	Y-20	Orta	10		29.09.2016	Negatif
68	Muğla	Bodrum	Y-20	Küçük	10			Negatif

Çizelge 3.8.Devam. Örneklenen levrek yetiştirme işletmeleri, örnek sayıları, örnekleme tarihleri ve test sonuçları.

Sıra No	İl	İlçe	İşletme Kodu	Örnek	Örnek Sayısı	İşletmeden Alınan Toplam Örnek Sayısı	Örnekleme Tarihi	Sonuç
69	Muğla	Bodrum	Y-21	Büyük	5	30	06.09.2016	Negatif
70	Muğla	Bodrum	Y-21	Küçük	10			Negatif
71	Muğla	Bodrum	Y-21	Küçük	10		20.09.2016	Negatif
72	Muğla	Bodrum	Y-21	Büyük	5			Negatif
73	Antalya	Konyaaltı	Y-22	Küçük-1	15	30	20.09.2016	Negatif
74	Antalya	Konyaaltı	Y-22	Küçük-2	15			Negatif
75	Adana	Karataş	Y-23	Küçük-1	10	30	20.09.2016	Pozitif
76	Adana	Karataş	Y-23	Küçük-2	10			Pozitif
77	Adana	Karataş	Y-23	Küçük-3	10			Pozitif
78	Hatay	İskenderun	Y-24	Orta-1	10	30	27.09.2016	Negatif
79	Hatay	İskenderun	Y-24	Orta-2	10			Negatif
80	Hatay	İskenderun	Y-24	Orta-3	10			Negatif
Toplam 7 İl 24 İşletme 80 Grup 720 Örnek								

Örnekleme zamanının belirlenmesinde virusun en aktif olarak bulunduğu yaz ayları dikkate alındı. Deniz su ısılarının aylık verileri ve değişiklikleri belirlenerek tüm örneklemler 2016 yılı Ağustos ve Eylül aylarında tamamlandı (Çizelge 3.8).

Yetiştirme işletmelerinde prevalansın belirlenmesinde, levreklerin yaş gruplarına bakılmaksızın, virusun herhangi bir yaş grubunda tespit edildiği işletme mihrak olarak değerlendirildi. Epidemiyolojik ünite seçiminde, VNN virusunun ülke genelindeki durumunun ortaya konulması amaçlandığından dolayı ülkenin tamamı bir ünite olarak değerlendirildi. qrtRT-PCR testleri sonucunda 20 işletmeden, 1 işletmede (Y-23) VNN virusu tespit edildi. İleride yapılacak çalışmalarda ve genbankta kullanılmak amacıyla, elde edilen betanodavirus izolatına TR.VNN.01.01 adı verildi. Bu değerlendirme ile 20 işletmeden 1 tanesinde virus tespit edildiğinden, Türkiye genelinde yetiştirme işletmeleri bazında betanodavirus prevalansı % 5 (1/20) olarak hesaplandı.

3.2.3. Retrospektif Epidemiyolojik Çalışma

VNN hastalığının ülkesel epidemiyolojisinin daha iyi ortaya konulması amacıyla virusun tespit edildiği kuluçkahane/yetiştirme işletmeleri ve bağlantılı olduğu işletmelerde tarama çalışması ve retrospektif epidemiyolojik çalışma yapıldı.

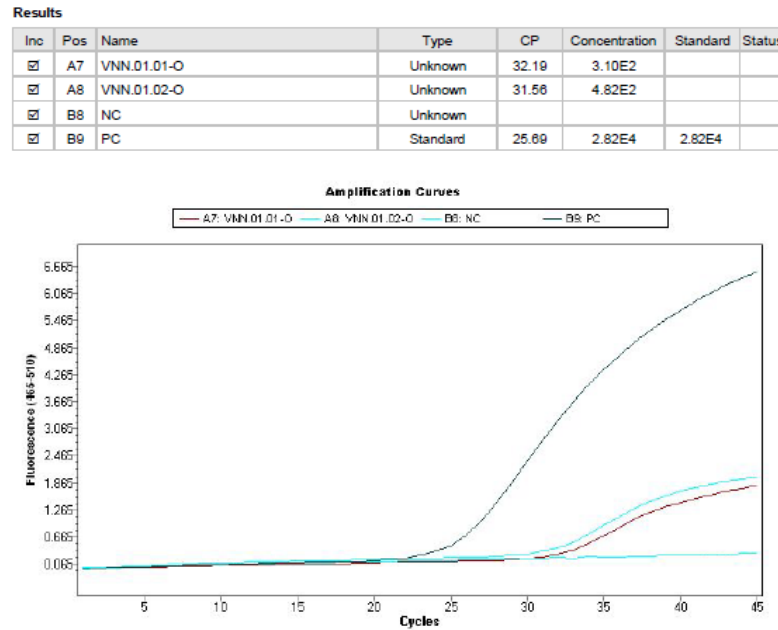
VNN virusu pozitif tespit edilen K-1 kuluçkahanesinde yapılan epidemiyolojik araştırmada, virusun 115 günlük, 2,5-3,74 g ağırlığında ve 6,5-7 cm uzunluğunda fingerling boy levreklerde tespit edildiği ortaya konuldu. Kuluçkahaneden alınan diğer örnekler incelendiğinde 15 günlük postlarva ve 70 günlük fry boy levreklerde virus tespit edilmedi. K-1 kuluçkahanesinde yapılan izleme çalışmasında, mevcut yetiştirme döneminde prelarva ve postlarva boy levrekler örnekledi ve bu örneklemelerde de virus tekrar tespit edilmedi. Virus tespit edilen kuluçkahanenin anaç balık bulundurmadığı, yetiştirilen balıkların ise K-12 kuluçkahanesinden sağlandığı belirlendi. K-12 kuluçkahanesinde yapılan epidemiyolojik araştırmada, kuluçkahanede anaç balık, döllenmiş yumurta ve prelarva yetiştirildiği belirlendi. K-12 kuluçkahanesinden Ocak 2017 ve Aralık 2018 tarihlerinde yapılan döllenmiş yumurta ve 2 günlük prelarva örneklemelerinde de virus tespit edilmedi. İki işletmede de VNN hastalığı yönünden klinik bir semptom olmadığı ve yoğun mortalitenin görülmediği bilgisi alındı.

Pozitif tespit edilen Y-23 kodlu yetiştirme işletmesinde yapılan epidemiyolojik araştırmada, virusun 3,2-10,4 g ağırlığında ve 6-10 cm uzunluğunda küçük boy levreklerde tespit edildiği ortaya konuldu. Virus tespit edilen işletmenin, virus tespit edilen K-1 kuluçkahanesi ile ilişkili olduğu ve bu kuluçkahaneden çıkan fingerling boy levreklerin Y-23 işletmesine geldiği belirlendi. Y-23 işletmesinde pozitif tespit edilen fingerling boy levreklerde de VNN hastalığı yönünden klinik bir semptom olmadığı ve yoğun mortalitenin görülmediği bilgisi alındı. Daha sonra işletme ile ilgili yapılan araştırmada, işletmenin tam bir deniz işletmesi olmadığı, kuluçkahaneden diğer yetiştirme işletmelerine gönderilmek üzere balıkların bekletildiği kuluçkahane sonrası ara bir işletme olduğu, orta veya büyük boy balık

olmadığı, sadece küçük boy balıkların olduğu belirlendi. Sonuç olarak K-1 ve Y-23 örnekleme ünitelerinin aynı levrek üretim firmasına ait olduğu belirlendi.

3.3. Pozitif Örneklerin Viral Yüklerinin Belirlenmesi

Real time RT-PCR testi ile pozitif bulunan örneklerin viral yüklerinin belirlenmesi amacıyla, örnekler analitik sensitivitesi belirlenen qrtRT-PCR testi ile tekrar test edildi. Pozitif örnekler, viral yükü bilinen plazmid DNA'sı ve negatif kontrol ile aynı teste alınarak viral yükleri belirlendi (Şekil 3.8 ve 3.9). Pozitif örneklerin direkt doku homojenizatlarından yapılan qrtRT-PCR testinde, Ct değerleri ve viral yükleri TR.VNN.01.01 izolatu için 32,19 ve $3,10 \times 10^2$ kopya/ μ l; TR.VNN.01.02 izolatu için ise 31,56 ve $4,82 \times 10^2$ kopya/ μ l olarak hesaplandı.

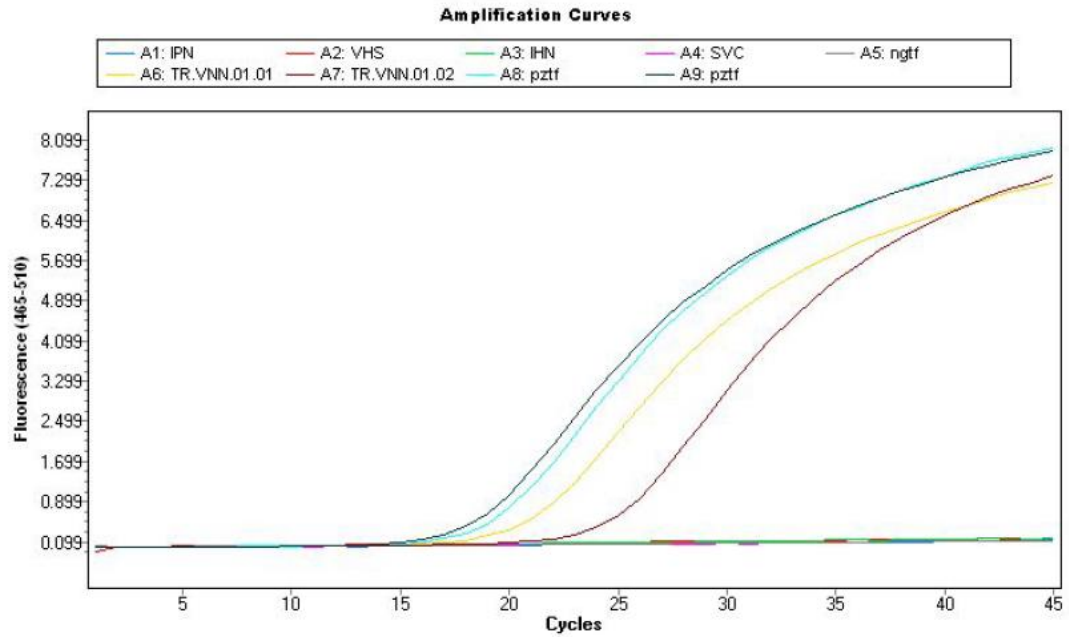


Şekil 3.8. Pozitif örneklerin direkt doku homojenizatlarından yapılan qrtRT-PCR testi sonuçları.

Tez çalışmasında qrtRT-PCR testi ile pozitif örneklerin belirlenmesinin ardından yapılan hücre kültüründe virus izolasyonu çalışmalarından sonra qrtRT-PCR testi tekrar yapıldı ve Ct değerleri ve viral yükleri TR.VNN.01.01 izolatu için 20,96 ve $7,29 \times 10^5$ kopya/ μ l; TR.VNN.01.02 izolatu için ise 24,87 ve $4,83 \times 10^4$ kopya/ μ l olarak hesaplandı.

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
☒	A1	IPN	Unknown				
☒	A2	VHS	Unknown				
☒	A3	IHN	Unknown				
☒	A4	SVC	Unknown				
☒	A5	ngtf	Unknown				
☒	A6	TR.VNN.01.01	Unknown	20.96	7.29E5		
☒	A7	TR.VNN.01.02	Unknown	24.87	4.83E4		
☒	A8	pztf	Standard	19.35	2.22E6	2.82E6	
☒	A9	pztf	Standard	18.66	3.59E6	2.82E6	



Şekil 3.9. Pozitif örneklerin hücre kültüründe izolasyonundan sonra yapılan qrtRT-PCR testi sonuçları.

Sahadan sağlanan örnekler ile bu örneklerin hücre kültüründe üretilmesinden sonra elde edilen Ct değerlerinde 7-12 Ct; viral yüklerde 10^2 - 10^3 kat artış olduğu gözlemlendi.

3.4. Pozitif Örneklerin Kısmi Genom Dizileme ve Filogenetik Analizleri

Pozitif bulunan örneklerin, hem tüm genom dizilemelerinin yapılabilmesi için gerekli olan primer çiftlerinin belirlenmesi hem de hangi genotipe ait olduğunun belirlenmesi amacıyla kısmi genom dizilemeleri ve filogenetik analizleri yapıldı. RNA1 segmentinin kısmi genom dizilemesinde, TR.VNN.01.01 izolatının 933 (192-

1124 nt'ler arası); TR.VNN.01.02 izolatının ise 937 (197-1133 nt'ler arası) nt uzunluğundaki bölgeleri (tüm genom dizisine sahip FJ789783 genbank erişim numaralı izolata göre) elde edildi.

RNA2 segmentinin kısmi genom dizilemesinde, TR.VNN.01.01 izolatının 569 (355-923 nt'ler arası); TR.VNN.01.02 izolatının ise 567 (365-931 nt'ler arası) nt uzunluğundaki bölgeleri (tüm genom dizisine sahip FJ789784 genbank erişim numaralı izolata göre) elde edildi.

Pozitif örneklerin dizileri ve genbanktan elde edilen referans dizilerin çoklu hizalamaları yapıldı. Filogenetik analizlerde, pozitif örneklerin elde edilen nt uzunluklarının daha fazla olmasına rağmen, daha fazla ve daha farklı coğrafyadaki izolatların karşılaştırmalarının yapılabilmesi amacıyla, RNA1 için 899 nt; RNA2 için 480 nt uzunluğundaki daha kısa bölgeler kullanıldı.

Filogenetik analiz için en iyi model RNA1 segmenti için Tamura-Nei ile gamma distributed (TN93+G); RNA2 segmenti için ise Kimura 2-parameter ile gamma distributed (K2+G) olarak belirlendi. Çalışmada elde edilen izolatlar ile genbanktan elde edilen referans izolatların nükleotid farklılıkları hem RNA1 hem RNA2 segmentine göre belirlendi (Çizelge 3.9 ve 3.10).

RNA1 segmentinin kısmi nükleotid dizilerine göre, tez çalışmasında bulunan RGNNV genotipindeki iki yerli izolatın nükleotid benzerlikleri kendi aralarında % 99,77 olarak bulundu. TR.VNN.01.01 izolatının RNA1 segmentinin kısmi dizilerine göre, en yakın olduğu izolat ise % 99,21 ile Güney Kıbrıs'ta levreklerden izole edilen betanodavirus olarak belirlendi. Güney Kıbrıs'ta sonra en yakın olduğu izolatlar ise % 98,74 ve % 98,62 ile İtalya'da üç farklı tatlı su balığından izole edilen betanodaviruslar ile Yunanistan'da çizgili lahozdan elde edilen betanodavirus olarak belirlendi. Değerlendirmeye filogenetik ağaça yer alan tüm referans izolatlar alınmamış olup, en yakın olduğu altı RGNNV izolatı alındı. Diğer genotiplerle olan benzerlikleri ise SJNNV ile % 73,14; BFNNV ile % 71,56; TPNNV ile ise % 71,74 olarak belirlendi.

RNA2 segmentinin kısmi nükleotid dizilerine göre, tez çalışmasında bulunan RGNNV genotipindeki iki yerli izolatın nükleotid benzerlikleri kendi aralarında %

100 olarak bulundu. TR.VNN.01.01 izolatının RNA2 segmentinin kısmi dizilerine göre, en yakın olduğu izolat ise % 99,58 ile Güney Kıbrıs'ta levreklerden izole edilen betanodavirus olarak belirlendi. Güney Kıbrıs'ta sonra en yakın olduğu izolat ise % 99,37 Yunanistan'da çizgili lahozdan elde edilen betanodavirus olarak belirlendi. Yüzde 99,15 oranında da yine üç farklı İtalya izolatı ile benzer bulundu. Değerlendirmeye filogenetik ağaçta yer alan tüm referans izolatlar alınmamış olup, en yakın olduğu altı RGNNV izolatı alındı. Diğer genotiplerle olan benzerlikleri ise SJNNV ile % 65,47; BFNNV ile % 73,80; TPNNV ile ise % 65,39 olarak belirlendi.

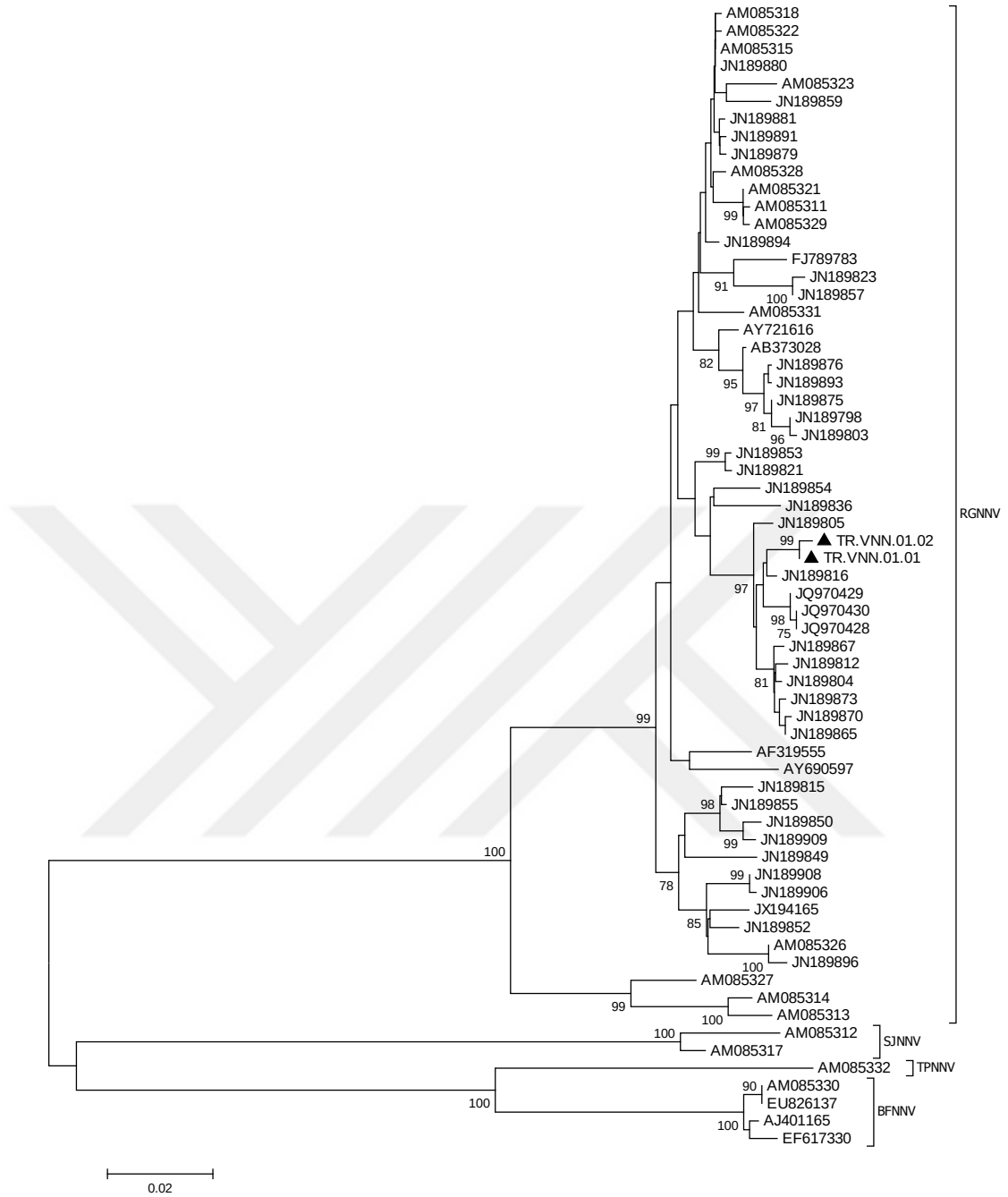
Virusun hem RNA1 hem RNA2 segmentine göre yapılan filogenetik analizinde, tez çalışmasında bulunan pozitif örneklerin RGNNV genotipi olduğu belirlendi (Şekil 3.10 ve 3.11).

Çizelge 3.9. RNA1 segmentinin kısmi dizilerine göre nükleotid benzerlik oranları (%).

TR.VNN.01.01	100,00											
TR.VNN.01.02	99,77	100,00										
JN189816	99,21	98,97	100,00									
JQ970429	98,74	98,50	99,32	100,00								
JQ970428	98,62	98,38	99,21	99,89	100,00							
JQ970430	98,62	98,38	99,21	99,89	100,00	100,00						
JN189867	98,62	98,38	99,21	98,97	98,85	98,85	100,00					
JN189805	98,62	98,38	99,21	98,97	98,85	98,85	99,09	100,00				
AM085317	73,14	73,42	73,42	72,96	72,76	72,76	73,89	74,08	100,00			
AM085330	71,56	71,85	72,15	71,76	71,55	71,55	71,85	71,85	74,13	100,00		
AM085332	71,74	72,01	71,59	71,24	71,04	71,04	71,31	71,74	73,33	88,54	100,00	
	TR.VNN.01.01	TR.VNN.01.02	JN189816	JQ970429	JQ970428	JQ970430	JN189867	JN189805	AM085317	AM085330	AM085332	

Çizelge 3.10. RNA2 segmentinin kısmi dizilerine göre nükleotid benzerlik oranları (%).

TR.VNN.01.01	100,00											
TR.VNN.01.02	100,00	100,00										
JN189968	99,58	99,58	100,00									
JN189959	99,37	99,37	99,79	100,00								
JN189994	99,15	99,15	99,58	99,37	100,00							
JN189966	99,15	99,15	99,58	99,37	100,00	100,00						
JN189958	99,15	99,15	99,58	99,37	100,00	100,00	100,00					
JQ970432	98,94	98,94	99,37	99,16	98,94	98,94	98,94	100,00				
JN189920	65,47	65,47	65,47	64,97	65,96	65,96	65,96	64,39	100,00			
AM085345	73,80	73,80	73,80	74,21	73,80	73,80	73,80	72,90	57,12	100,00		
D38637	65,39	65,39	65,39	64,91	65,87	65,87	65,87	66,29	72,70	64,88	100,00	
	TR.VNN.01.01	TR.VNN.01.02	JN189968	JN189959	JN189994	JN189966	JN189958	JQ970432	JN189920	AM085345	D38637	



Şekil 3.10. RNA1 segmentinin kısmi dizilerine göre filogenetik ağaç. Filogenetik ağaç, Tamura-Nei ile gamma distributed (TN93+G) model kullanılarak 1000 tekrarlı bootstrap değeri ile oluşturuldu. Filogenetik ağaçta % 70 ve üstü bootstrap değerleri gösterilmiştir. RNA1 segmentine ait filogenetik ağaç, elde edilen izolatların RNA1 segmentlerinin 899 nt uzunluğundaki dizileri (Referans tüm genom RNA1, FJ789783'e göre 200-1099 nt arası) kullanılarak çizilmiştir.

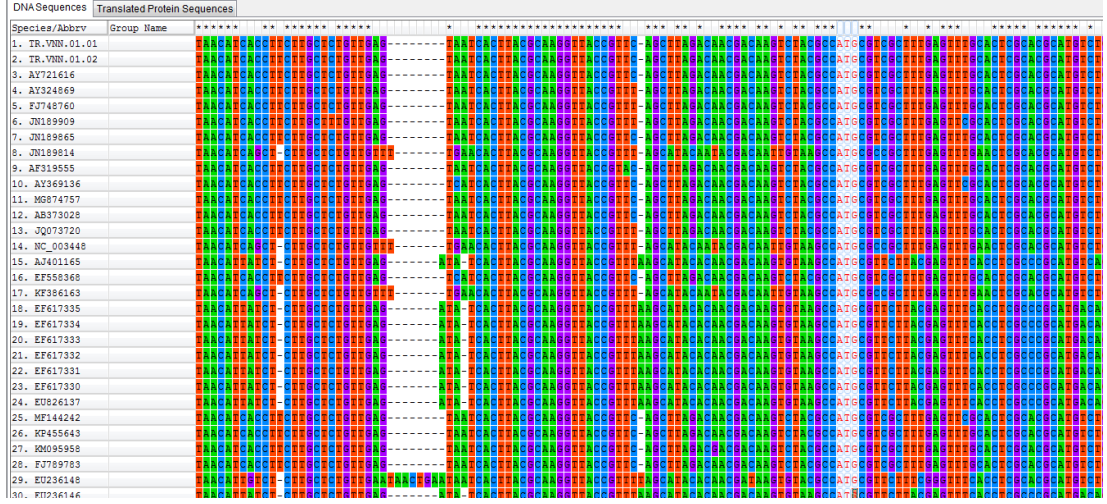
Kuluçkahane ve yetiştirme işletmesinden elde edilen virusların aynı coğrafyadan köken alması, aynı ticari firmaya ait olması ve işletme ile kuluçkahane arasındaki ilişkili olmasının epidemiyolojik çalışmalar ile belirlenmesinin ardından, aynı ilişki filogenetik analizler ile de ortaya konuldu.

3.5. Pozitif Örneklerin Tüm Genom Dizileme ve Filogenetik Analizleri

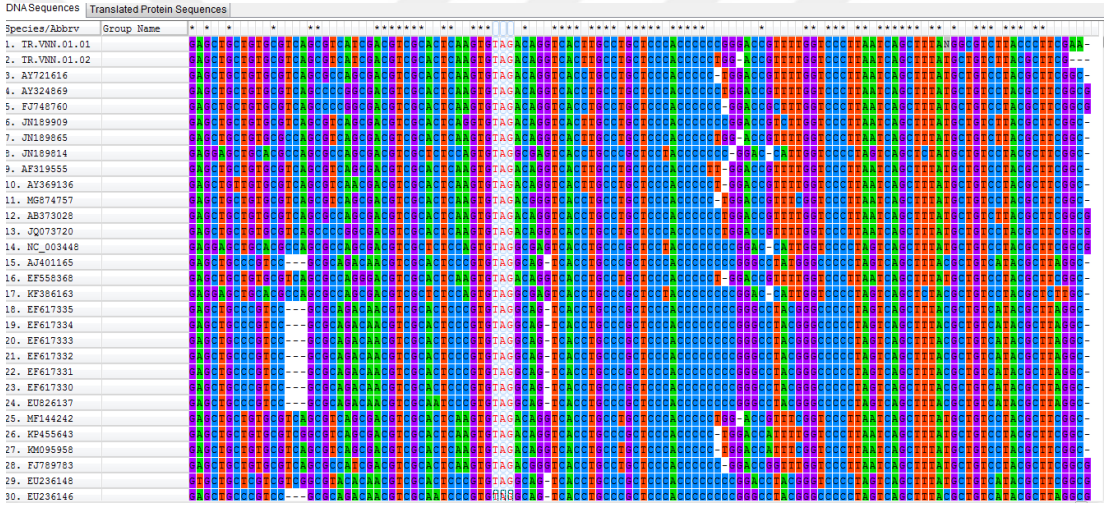
Kısmi dizileme ve filogenetik analizleri ile genotipleri belirlenen pozitif betanodavirus izolatlarının tüm genom dizileri, RNA1 ve RNA2 segmentlerinin tüm gen bölgelerini kapsayacak şekilde elde edildi. Düzeltme ve eşleştirme çalışmalarının DNADynamo programında yapılmasından sonra her iki segmente ait konsensüs dizileri elde edildi (Ek-3). MEGA6 programında tez izolatlarının ve genbanktan alınan dört farklı betanodavirus referans virus dizilerinin (Ek-5) çoklu hizalamaları yapıldı. Tüm genom RNA1 ve RNA2 dizilerinin 5' ve 3' UTR bölgeleri ile ORF bölgeleri belirlendi (Şekil 3.12, 3.13, 3.17 ve 3.18).

3.5.1. RNA1 Tüm Genom Analizi

RNA1 tüm genom dizi çalışmasında, Y-23 yetiştirme işletmesinden elde edilen TR.VNN.01.01 betanodavirus izolatı 3104 nt, K-1 kuluçkahanesinden elde edilen TR.VNN.01.02 betanodavirus izolatı ise 3102 nt olarak konsensüs dizileri elde edildi (Ek-3). RNA1 segmentinin 5' ve 3' UTR bölgeleri, Okinaka ve Nakai (2008) tarafından dört genotipin tüm genomlarının farklılıklarının belirlendiği çalışmayla uyumlu olarak, 5' UTR bölgesinde TPNNV genotipindeki nt fazlalığına bağlı olarak diğer genotiplerde görülen 7-8 nt'lik boşlukların meydana geldiği görüldü (Şekil 3.12). Benzer şekilde 3' UTR bölgesinde de BFNNV ve RGNNV genotiplerinde 1 nt eksikliğinin olduğu görüldü (Şekil 3.13).

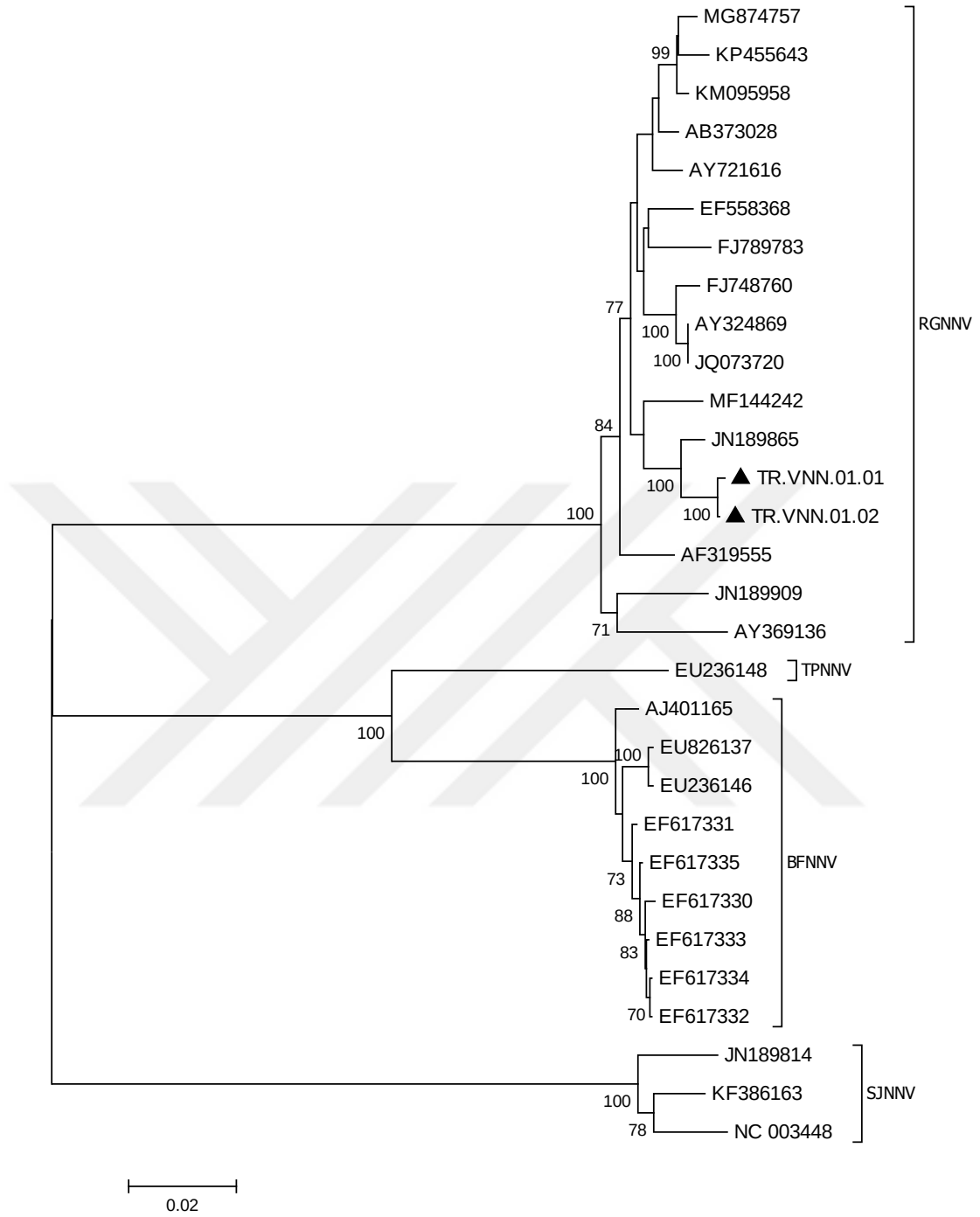


Şekil 3.12. Hizalanmış RNA1 segmentinin 5' UTR ve ORF başlangıç bölgesi.



Şekil 3.13. Hizalanmış RNA1 segmentinin 3' UTR ve ORF bitiş bölgesi.

RNA1 segmentinin filogenetik analizi için en iyi model Tamura-Nei ve gamma distributed (TN93+G) olarak belirlendi. Çalışmada elde edilen izolatlar ile genbanktan elde edilen referans izolatların nt ve aa benzerliklikleri ile farklılıkları, virusun farklı sıcaklıklara adaptasyonunu sağlayan ve RNA1 tarafından kodlanan Protein A'ya göre belirlendi. Bu amaçla Protein A'nın başlangıç ve bitiş kodonları belirlenerek (Şekil 3.12 ve 3.13) tüm genom protein A ORF dizileri incelendi. ORF başlangıcı olan ATG kodonunun pozisyonu 88. nt, bitiş olan TAG kodonunun pozisyonu ise 3037. nt olarak belirlendi. 87 nt'ten oluşan 5' UTR bölgesi ve 3037. nt'ten sonra gelen 3' UTR kesilerek; 2949 nt ve 983 aa uzunluğundaki protein A'ya göre filogenetik ağaç çizildi (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. RNA1 segmentinin ORF protein A nükleotid dizilerine göre filogenetik ağaç. Filogenetik ağaç, Tamura-Nei ile gamma distributed (TN93+G) model kullanılarak 1000 tekrarlı bootstrap değeri ile oluşturuldu. Filogenetik ağaçta % 70 ve üstü bootstrap değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.11. Protein A (RNA1 ORF) tüm genom dizilerine göre nükleotid benzerlik oranları (%).

TR.VNN.01.01	100,00																
TR.VNN.01.02	99,83	100,00															
JN189865	98,75	98,85	100,00														
MF144242	97,46	97,50	97,76	100,00													
AF319555	97,27	97,34	97,57	97,15	100,00												
AY324869	97,05	97,17	97,43	97,64	97,90	100,00											
AB373028	97,06	97,18	97,44	98,31	97,68	98,42	100,00										
JQ073720	97,05	97,17	97,43	97,64	97,90	100,00	98,42	100,00									
AY721616	97,01	97,13	97,43	97,89	97,74	98,30	99,06	98,30	100,00								
KM095958	96,96	97,08	97,42	98,42	97,53	98,05	99,07	98,05	98,74	100,00							
EF558368	96,95	97,07	97,33	97,39	97,57	98,38	98,17	98,38	98,27	97,84	100,00						
FJ789783	96,92	97,04	97,38	97,20	97,46	97,87	97,79	97,87	97,75	97,61	97,98	100,00					
FJ748760	96,86	96,97	97,23	97,22	97,60	99,34	98,12	99,34	98,07	97,79	98,05	97,60	100,00				
EU236146	75,91	76,16	75,91	76,73	77,28	76,88	77,17	76,88	77,05	77,17	76,19	77,04	76,94	100,00			
EU236148	76,88	77,05	76,43	76,50	77,00	76,45	76,53	76,45	76,57	76,34	76,46	76,87	76,81	90,14	100,00		
JN189814	74,89	75,11	75,69	75,50	75,64	74,99	75,90	74,99	75,90	75,71	75,15	74,86	75,09	77,12	75,58	100,00	
TR.VNN.01.01		TR.VNN.01.02		JN189865		MF144242		AF319555		AY324869		AB373028		JQ073720		AY721616	
										KM095958		EF558368		FJ789783		FJ748760	
																EU236146	
																EU236148	
																JN189814	

Protein A tüm genom nükleotid dizilerine göre, tez çalışmasında bulunan RGNNV genotipindeki iki yerli izolatın nükleotid benzerlikleri kendi aralarında % 99,83 olarak bulundu. TR.VNN.01.01 izolatının Protein A tüm genom nükleotid dizilerine göre, en yakın olduğu izolat ise % 98,75 ile İtalya'da levreklerden izole edilen betanodavirus olarak belirlendi. İtalya'dan sonra en yakın olduğu izolat ise % 97,46 Tayvan'da portakal benekli lahos (orange-spotted grouper-*Epinephelus coioides*)'dan elde edilen betanodavirus olarak belirlendi. % 97,27 oranında Singapur; % 97, 06 Japonya; % 97, 05 Çin ve Hindistan izolatları ile benzer bulundu. Değerlendirmeye filogenetik ağaçta yer alan tüm referans izolatlar alınmamış olup, en yakın olduğu onbir adet RGNNV izolatı alındı. Diğer genotiplerle olan benzerlikleri ise SJNNV ile % 74,89; BFNNV ile % 75,91; TPNNV ile ise % 76,88 olarak belirlendi (Çizelge 3.11).

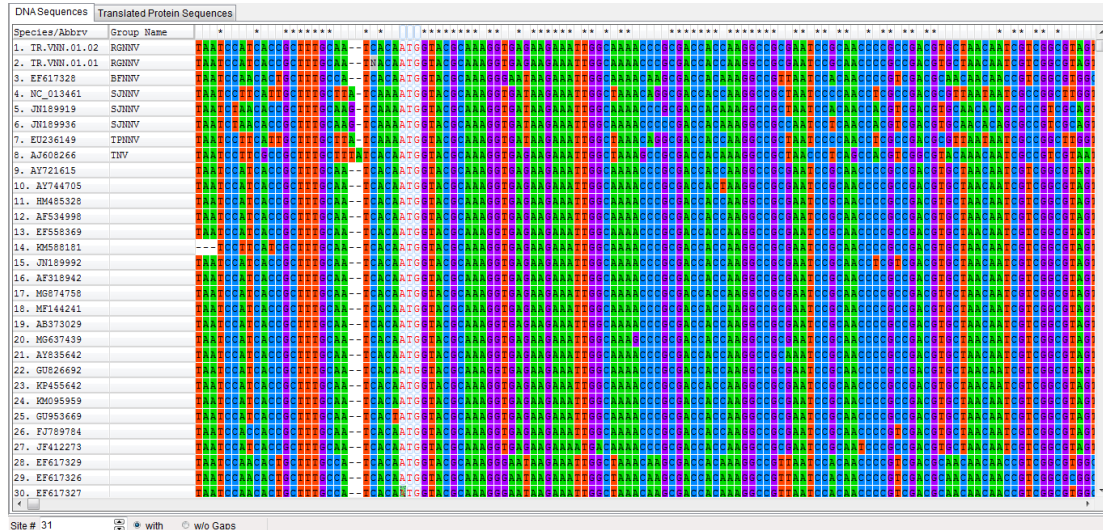
Protein A filogenetik analizinde, nt ve aa farklılıklarının araştırılması sadece RGNNV genotipleri kullanılarak yapıldı. SJNNV, BFNNV ve TPNNV genotiplerinin gerek coğrafi lokalizasyonlarının çok farklı olması, gerek izole edildikleri türlerin sıcaklık adaptasyonunun RGNNV genotipine göre çok farklı olması nedeniyle nt ve aa farklılık değerlendirmesine alınmadı.

RNA1 tüm genom nükleotid dizilerine göre nükleotid farklılıkları incelendiğinde, TR.VNN.01.01 ve TR.VNN.01.02 izolatlarının sadece kendi aralarında toplam yedi nt farklılığının olduğu ortaya konuldu. Bu farkların 239 (C;T), 2511 (A;T), 2533 (G;T), 2566 (S (?);G), 3088 (G;C), 3089 (C;T) ve 3097 (C;G) nt pozisyonlarında olduğu belirlendi (Şekil 3.15, turuncu zemin). Referans izolatların hemen hemen tamamının aynı, ancak TR.VNN.01.01 ve TR.VNN.01.02 izolatlarından tamamen farklılık gösterdiği toplam 37 nt pozisyonu belirlendi (Şekil 3.15, mavi zemin).

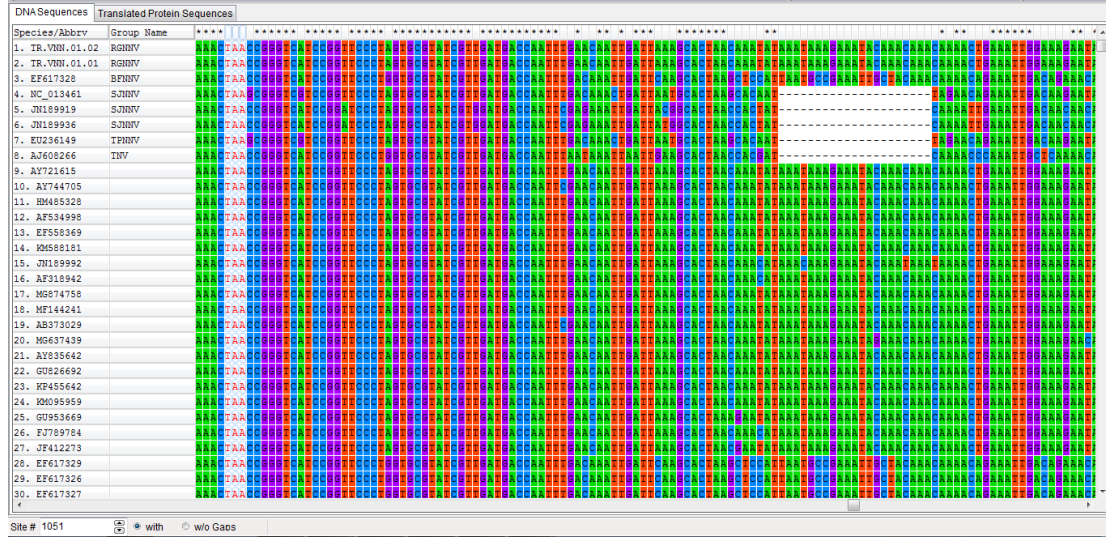
3.5.2. RNA2 Tüm Genom Analizi

RNA2 tüm genom dizi çalışmasında, Y-23 yetiştirme işletmesinden elde edilen TR.VNN.01.01 betanodavirus izolatı 1432 nt; K-1 kuluçkahanesinden elde edilen TR.VNN.01.02 betanodavirus izolatı ise 1380 nt olarak konsensüs dizileri elde edildi (Ek-3).

RNA2 segmentinin 5' ve 3' UTR bölgeleri, Okinaka ve Nakai (2008) tarafından dört genotipin tüm genomlarının farklılıklarının belirlendiği çalışmayla uyumlu olarak, 5' UTR bölgesinde; TNV genotipindeki nt fazlalığına bağlı olarak TPNNV ve SJNNV genotiplerinde 1; BFNNV ve RGNNV genotiplerinde ise 2 nt'lik boşlukların meydana geldiği görüldü (Şekil 3.17). Benzer şekilde 3' UTR bölgesinde TNV, TPNNV ve SJNNV genotiplerinde ardışık 21 nt'li boşlukların olduğu belirlendi. Ayrıca, 3' UTR bölgesinin uzunluğunun RNA1 segmentinin 5' ve 3' UTR bölgeleri ile RNA2 segmentinin 5' UTR bölgesinden çok daha uzun olduğu belirlendi. Bu uzunluğun TPNNV'de 372; SJNNV'de 371; TNV'de ise 366 nt; BFNNV ve RGNNV'de ise diğerlerinden farklı olarak 18-24 nt daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 3.18).

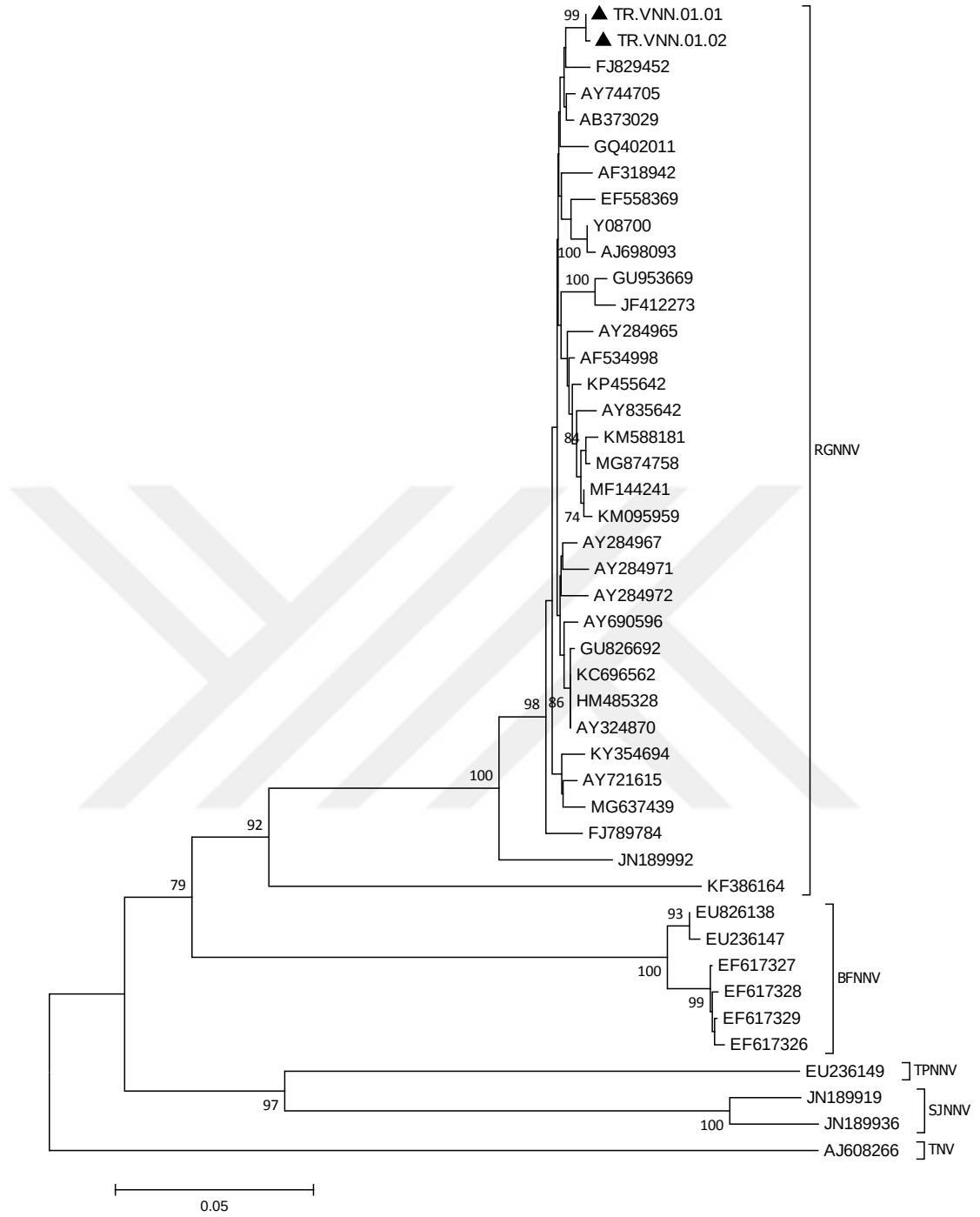


Şekil 3.17. Hizalanmış RNA2 segmentinin 5' UTR ve ORF başlangıç bölgesi.



Şekil 3.18. Hizalanmış RNA2 segmentinin 3' UTR (başlangıç kısmı) ve ORF bitiş bölgesi.

RNA2 segmentinin filogenetik analizi için en iyi model Tamura 3 parameter ile gamma distributed (T92+G) olarak belirlendi. Çalışmada elde edilen izolatlar ile genbanktan elde edilen referans izolatlarının nt ve aa dizilimlerinin benzerlikleri ve farklılıkları, virusun konakçı spesifitesini belirleyen ve RNA2 tarafından kodlanan tüm genom kapsid proteini (CP)'ne göre belirlendi. Bu amaçla kapsid proteininin başlangıç ve bitiş kodonları belirlenerek (Şekil 3.17 ve 3.18) tüm genom kapsid proteini ORF dizileri incelendi. ORF başlangıcı olan ATG kodonunun pozisyonu 27. nt olarak, bitiş olan TAA kodonunun pozisyonu 1041. nt belirlendi. 26 nt'ten oluşan 5' UTR bölgesi ve 1041. nt'ten sonra gelen 3' UTR kesilerek; 1014 nt ve 338 aa uzunluğundaki kapsid proteini'ne göre filogenetik ağaç çizildi (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. RNA2 segmentinin kapsid proteini tüm nükleotid dizilerine göre filogenetik ağaç. Filogenetik ağaç, Tamura 3 parameter ile gamma distributed (T92+G) model kullanılarak 1000 tekrarlı bootstrap değeri ile oluşturuldu. Filogenetik ağaçta % 70 ve üstü bootstrap değerleri gösterilmiştir.

Kapsid protein tüm genom nükleotid dizilerine göre, tez çalışmasında bulunan RGNNV genotipindeki iki yerli izolatın nükleotid benzerlikleri kendi aralarında % 99,90 olarak bulundu. TR.VNN.01.01 izolatının kapsid protein tüm genom nt dizilerine göre, en yakın olduğu izolatlar ise % 99,20 ile Çin'de Hong Kong grouper (*Epinephelus akaara*) ve Japonya'da sevenband grouper (*Hyporthodus septemfasciatus*)'den izole edilen betanodavirus olarak belirlendi. Daha sonra en yakın olduğu izolatlar ise % 98,89 ile Hindistan'da asya levreği (*Lates calcarifer*)'nden, Japonya'da grouperlerden (*Epinephelus septemfasciatus*) ve Çin'de lahozdan (*Epinephelus coioides*) elde edilen betanodavirus olarak belirlendi. Daha sonra en yakın olduğu izolatlar ise sırasıyla Tayvan, Hindistan, Çin, Çin, Singapur, Çin ve Tayvan olarak belirlendi (Çizelge 3.12).

Tüm genom RNA2 dizisi genbankta bulunan Akdeniz izolatlarının nt yakınlıkları uzakdoğu izolatlarından daha uzak bulundu. Tunus'ta levreklerden izole edilen FJ789784 izolatı ile % 98,06; İtalya'da yine levreklerden izole edilen JN189992 izolatı ile ise % 95,20 nt yakınlığı belirlendi. Değerlendirmeye filogenetik ağaça yer alan tüm referans izolatlar alınmamış olup, en yakın olduğu onüç adet RGNNV izolatı alındı. Diğer genotiplerle olan benzerlikleri ise BFNNV ile % 76,92; SJNNV ile % 72,19; TPNNV ile % 71,46; TNV ile 67,59 olarak bulundu (Çizelge 3.12).

RNA2 segmentinin tüm genom kapsid proteini (CP)'ne göre filogenetik analizinde yerli izolatlar ile genbanktan alınan izolatların nt yakınlıklarının değerlendirilmesinde; en yakın olan izolatların uzak doğu/Hint okyanusunda bulunan ülkeler olduğunun belirlenmesinin ardından, Akdeniz havzasında bulunan ülkelere elde edilen izolatlar ile yakınlıklarının belirlenmesi için daha farklı bir yaklaşım kullanıldı. Buna göre, RNA2 filogenetik analizinde genbanktan izolat seçiminde RNA2 segmentinin tüm genom nt dizilerine sahip olan izolatlar dikkate alınmıştı. Ancak bu yöntemle göre Akdeniz havzasından sadece iki izolat değerlendirmeye alınabilmiş, bunların da yakınlıkları uzakdoğudan daha az bulunmuştur.

Akdeniz izolatlarına ulaşmak için farklı bir yöntem olarak, tüm genom RNA2 yerine, sadece tüm genom kapsid proteini nt dizisine sahip olan tüm Akdeniz izolatları ile tekrar karşılaştırma yapıldı. Hizalamaların yapılmasından sonra en iyi model Tamura 3 parameter ile gamma distributed (T92+G) olarak tekrar belirlendi. TR.VNN.01.01 izolatının kapsid protein tüm genom nükleotid dizilerine göre, en yakın izolatlar % 98,89 ile İspanya'da kalkan ve levrekten, % 98,79 ile İsrail'de lahozdan, % 98,48 ile Yunanistan'da levrek ve İsrail'de lahozdan, % 98,37 ile İsrail % 98,28 ile Fransa ve % 98,27 ile Yunanistan'da levreklerden izole edilen betanodaviruslar olarak belirlendi. Yerli izolatın İtalya'da çipuralardan izole edilen betanodavirus ile nt benzerliği ise % 98,05 olarak bulundu (Çizelge 3.13).



Çizelge 3.12. Kapsid Protein (RNA2 ORF) tüm genom dizilerine göre nükleotid benzerlik oranları (%).

İzolat	Nt Yakınlığı																				Ülke		
TR.VNN.01.01	100																				Türkiye		
TR.VNN.01.02	99,90	100																			Türkiye		
AY744705	99,20	99,09	100																		Çin		
AB373029	99,20	99,09	99,60	100																	Japonya		
HM485328	98,89	98,79	99,30	99,30	100																Hindistan		
AF534998	98,89	98,79	99,10	99,10	99,20	100															Çin		
AY324870	98,89	98,79	99,30	99,30	100	99,20	100														Japonya		
AY690596	98,79	98,68	98,99	98,99	99,50	99,10	99,50	100													Tayvan		
GU826692	98,79	98,68	99,20	99,20	99,90	99,10	99,90	99,40	100												Hindistan		
EF558369	98,69	98,58	98,69	98,69	98,79	98,58	98,79	98,48	98,69	100											Çin		
MG874758	98,68	98,58	98,68	98,68	98,79	99,40	98,79	98,68	98,68	98,17	100										Çin		
AF318942	98,37	98,27	98,79	98,79	98,89	98,69	98,89	98,58	98,79	98,48	98,48	100									Singapur		
MG637439	98,37	98,26	98,79	98,79	98,68	98,69	98,68	98,58	98,58	98,06	98,27	98,16	100								Çin		
AY835642	98,37	98,27	98,48	98,48	98,58	99,10	98,58	98,37	98,48	98,38	99,10	98,27	98,27	100							Tayvan		
FJ789784	98,06	97,96	98,27	98,27	98,38	98,28	98,38	98,27	98,27	97,96	97,85	97,86	97,85	97,96	100						Tunus		
JF412273	97,85	97,75	98,06	98,28	98,17	98,38	98,17	98,28	98,06	97,64	98,17	97,64	97,64	97,64	97,11	100					Hindistan		
JN189992	95,20	95,32	95,32	95,32	95,43	94,97	95,43	95,32	95,55	94,85	94,50	94,75	95,09	94,63	94,76	94,17	100				İtalya		
EF617329	76,91	76,73	76,73	76,55	76,91	77,29	76,91	76,73	76,73	77,10	76,75	76,77	76,52	76,58	77,24	75,49	74,98	100			BFNNV		
JN189919	72,19	72,39	71,59	71,59	70,98	71,41	70,98	71,39	71,19	70,78	70,80	70,82	70,58	70,61	70,94	70,43	71,06	69,25	100			SJNNV	
EU236149	71,46	71,46	71,04	71,04	71,25	71,48	71,25	71,25	71,46	71,46	71,48	71,04	71,06	71,70	70,88	70,07	71,90	68,98	74,00	100			TPNNV
AJ608266	67,59	67,36	66,68	66,45	66,45	67,78	66,45	67,13	66,68	66,75	67,56	65,99	66,46	67,14	67,13	64,74	66,11	63,33	60,87	62,16	100		TNV
	TR.VNN.01.01	TR.VNN.01.02	AY744705	AB373029	HM485328	AF534998	AY324870	AY690596	GU826692	EF558369	MG874758	AF318942	MG637439	AY835642	FJ789784	JF412273	JN189992	EF617329	JN189919	EU236149	AJ608266		

Çizelge 3.13. Kapsid Protein (RNA2 ORF) tüm genom dizilerine göre Akdeniz İzolatlarının nükleotid benzerlik oranları (%).

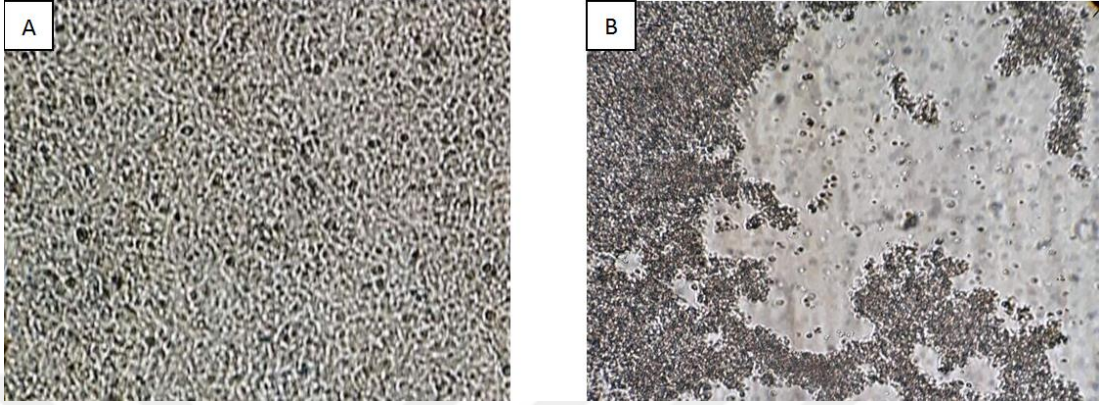
İzolat	Nt Yakınlığı												Ülke	
TR.VNN.01.01	100												Türkiye	
TR.VNN.01.02	99,90	100										Türkiye		
FJ829452	98,89	98,79	100								İspanya			
KC696562	98,89	98,79	98,79	100							İspanya			
AY284967	98,79	98,69	98,69	99,10	100							İsrail		
Y08700	98,48	98,38	98,38	99,00	98,69	100						Yunanistan		
AY284965	98,48	98,37	98,37	98,58	98,69	98,59	100					İsrail		
AY284971	98,37	98,27	98,27	99,10	98,99	98,48	98,27	100				İsrail		
AJ698093	98,28	98,17	98,17	98,79	98,48	99,80	98,38	98,27	100				Fransa	
AY284972	98,27	98,16	98,16	98,99	98,89	98,59	98,16	98,68	98,38	100			Yunanistan	
KY354694	98,05	97,94	97,94	98,79	98,69	98,17	97,95	98,27	97,96	98,37	100			İtalya
FJ789784	97,96	97,85	97,85	98,27	98,59	98,27	97,96	97,96	98,07	97,85	97,85	100		Tunus
JN189992	95,09	95,21	94,62	95,32	95,44	94,65	94,39	94,74	94,42	95,10	95,09	94,77	100	İtalya
	TR.VNN.01.01	TR.VNN.01.02	FJ829452	KC696562	AY284967	Y08700	AY284965	AY284971	AJ698093	AY284972	KY354694	FJ789784	JN189992	

Kapsid proteini (RNA2 ORF) filogenetik analizinde, nt ve aa farklılıklarının araştırılması sadece RGNNV genotipleri kullanılarak yapıldı. SJNNV, BFNNV, TPNNV ve TNV genotiplerinin gerek coğrafi lokalizasyonlarının gerek izole edildikleri türlerin farklı olması, ayrıca yapısal olarak nt sayılarının doğal olarak RGNNV genotipine göre farklı veya fazla olması nedeniyle nt ve aa farklılık değerlendirmesine alınmadı.

Kapsid proteini tüm genom nükleotid dizilerine göre nükleotid farklılıkları incelendiğinde, TR.VNN.01.01 ve TR.VNN.01.02 izolatlarının kendi aralarında sadece 630. nt (A;G) pozisyonunda farklılık olduğu belirlendi (Şekil 3.20, açık mavi zemin). Referans izolatların hemen hemen tamamının aynı, ancak TR.VNN.01.01 ve TR.VNN.01.02 izolatlarından tamamen farklılık gösterdiği 267. (G;A), 564. (C;T), 766. (G;A) ve 792. (C;T) nt'ler olmak üzere toplam 4 nt pozisyonu belirlendi (Şekil 3.20, gri zemin).

Kapsid proteini tüm genom aa farklılıkları incelendiğinde, TR.VNN.01.01 ve TR.VNN.01.02 izolatlarının kendi aralarında herhangi bir farklılığının bulunmadığı belirlendi. İki yerli izolat ile referans izolatlar arasında ise sadece 256. aa pozisyonunda farklılık olduğu ortaya konuldu. 256. aa'in, yerli izolatlarda izölöysin, referans izolatlarda ise valin olduğu belirlendi (Şekil 3.21, açık yeşil zemin).

SSN-1 hücre kültüründe izolasyonundan sonra, E-11 hücre hattına tekrar inokülasyon yapıldı ve iki pasaj sonunda virus adaptasyonu sağlanarak E-11 hücre hattında da virus izolasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 3.22. qrtRT-PCR ile VNN virusu pozitif bulunan örneklerin SSN-1 hücre hattında CPE görüntüsü. A: Hücre Kontrol; B: TR.VNN.01.02 pozitif örneğin 7.gün CPE görüntüsü: vakuolizasyon ve lizis).

4. TARTIŞMA

Viral Nervöz Nekrozis'in varlığı, su ürünleri yetiştiriciliğinin sürdürülebilirliği ve gelişimi anlamında en büyük zorluktur (Toffan ve ark., 2017). VNN etkeni betanodavirusların küresel olarak su ürünleri yetiştiriciliği üretimine yönelik önemli bir risk oluşturduğu vurgulanmaktadır (Costa ve Thompson, 2016).

Virus, temel olarak SJNNV, RGNNV, BFNNV ve TPNNV olmak üzere dört genotipte klasifiye edilmektedir. Her genotipin adapte olduğu bir su sıcaklığı ve buna bağlı duyarlı türleri bulunmaktadır. Ancak son yıllarda virusun reassortment özelliğinden dolayı ortaya çıkan RGNNV/SJNNV ve SJNNV/RGNNV reassort genotipleri önem kazanmış ve duyarlı olmayan türlerde replike olarak salgınlar meydana getirmiştir.

VNN, dünya üzerinde gerek kültürü yapılan balıklarda gerek yabani populasyonlarda yüzden fazla balık türünde hastalığa neden olmaktadır. Bunun yanında artemia, rotifer, su solucanları ve yumuşakçalarda da virus tespit edilmiştir. Virus en çok, levrek türleri, çipuralar, grouperler ve Atlantik halibut ile cod gibi balıklarda daha fazla hastalık oluşturmaya ve yayılma neden olmasına rağmen, duyarlı olmayan türler ve asemptomatik balıklar virusun saçılımı ve yayılımında etkilidir.

VNN, tüm yaş dönemlerinde etkili olmasına rağmen larvalar etkilendiğinde % 100'e varan yüksek mortaliteler oluşabilmekte, juvenil ve daha büyük boy balıklarda ise genellikle daha az kayıplarla hastalık atlatılabilmektedir (Anonim, 2017a). VNN virusunun, patogenetik hedef organlarının beyin, spinal cord ve optik siniri içeren göz olmasına rağmen, özellikle anaçların gonad dokularında da virus replikasyonunun varlığı gösterilmiştir. Bu nedenle damızlıkta kullanılan anaçlarının virus taşıyıp taşımadıklarının belirlenmesine yönelik güvenilir testlerin geliştirilmesi gelecek için kritik bir konudur (Toffan ve ark., 2017).

VNN hastalığı için başlıca hedef organlar merkezi sinir sistemi ve retinadır. Etkilenen organlarda vakuolizasyonlarla ilişkili olarak doku kayıpları meydana gelir ve buna bağlı olarak sinirsel semptomlar, anormal yüzme davranışları, görüş kaybına bağlı olarak eksternal yaralanmalar ve ölüm meydana gelmektedir. Klinik belirtiler ile su sıcaklığı arasında çok güçlü bir ilişki vardır, klinik belirtilerin görülmesi sıcaklıktan önemli ölçüde etkilenir. Su sıcaklığı ayrıca farklı genotiplerin mortalitesi üzerine etkilidir ve virusun aktif dönemine geçebilmesi ve salgınlar meydana getirmesi için optimum su sıcaklığına ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için salgınlar yılın her döneminde aynı oranda görülmemektedir.

Virus Güney Amerika hariç dünyanın pek çok bölgesinde farklı su sıcaklıklarına adapte olmuş pek çok deniz balığında farklı genotiplerde tespit edilmiştir. Tespit edilen genotiplerin coğrafi dağılımı su sıcaklığı ile ilişkilidir. Dünya üzerinde en çok tespit edilen genotip RGNNV'dir ve bu genotip Akdeniz havzasında da endemik olarak bulunmaktadır.

Türkiye'de VNN virusu ilk kez 2011 yılında tespit edilmiştir (Özkan Özyer ve ark., 2014). Balık hastalıkları ulusal referans laboratuvarı İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından gerçekleştirilen tarama çalışmalarında da 2012 ve 2014 yıllarında levrek ve çipura yavrularında virus tekrar tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan izleme çalışmalarında ise 2014 yılında virus tespit edilen kuluçkahaneden yavru alan başka bir işletmede klinik enfekte levrek yavrularında virus yeniden tespit edilmiştir (Kalaycı ve ark., 2016).

VNN hastalığının teşhisinde, hücre kültüründe virus izolasyonu, immunfloresan, elektron mikroskopi, histopatoloji, serolojik testler ve moleküler tabanlı nükleik asit tespit testleri kullanılabilir. Bununla birlikte mevcut testlerin sensitivitesi, spesifitesi, uygulanabilirliği açısından değerlendirildiğinde, teşhis amacına göre uygun olan test belirlenmelidir. Hücre kültüründe virus izolasyonunu takiben immun boyama veya moleküler identifikasyon testleri hala altın standart olarak gösterilmektedir (Anonim, 2017a). Altın standart metot olmamasına rağmen, sensitivite, spesifite ve uygulanabilirlik açısından valide edilmiş

Real-Time RT-PCR testleri ise rutin teşhis ve epidemiyolojik araştırmalarda önerilmektedir.

Betanodaviruslar, balıkları etkileyen en stabil viruslardan biri olduğundan dolayı, bir çiftliğin enfekte olmasından sonra, virusun ortadan kaldırılması çok zor olabilmektedir (Frerichs ve ark., 1996). VNN kontrolü için aşılamaı da içeren etkili profilaktif önlemlerin alınması gereklidir, üretimin damızlık ve larval aşamaları hedeflenerek vertikal bulaşma ile mücadele edilerek sektörün sürdürülebilirliği sağlanmalıdır (Costa ve Thompson, 2016).

Hastalık ile ilgili korunma ve kontrol stratejileri tasarlanırken mevcut biyogüvenlik önlemleri, anaçların durumu, coğrafi konum, genotip, çevre sıcaklığı ve üretim amacı ile üretim dönemleri gibi etmenlerin dikkate alınması, hastalığın bulaşmasını, yaygınlığının azaltılmasını veya ortadan kaldırılmasında önemli noktalarır. En etkili korunma ve kontrol yöntemi işletme yönetimi, temizlik, dezenfeksiyon, işletmeye kontamine olmayan bölgelerden balık temini, işletmeye balık dışındaki unsurların giriş ve çıkışlarının kontrolü, kullanılan suyun UV ve filtre sistemleri ile sterilizasyonunu içeren biyogüvenlik önlemleri, anaçların periyodik olarak virolojik ve serolojik olarak taranması ve aşılamalardır. İnaktif aşılar, rekombinant aşılar, virus benzeri parçacıklar, sentetik peptit aşıları ve DNA aşıları korunmada kullanılabilmektedir.

Hastalık hem Avrupa Birliği'nde hem de Türkiye'de ihbarı mecburi bir hastalık olmamasından dolayı hastalıkla ilgili yasal yaptırımlar bulunmamasına rağmen, persistenslik özelliğinden dolayı çiftlik sahipleri genellikle anaçları değiştirmektedirler.

Viral hastalıklarının tedavisinde kullanılan yöntemlerin bazıları VNN hastalığında da denenmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Bunlardan virus replikasyonunu inhibe eden antiviral ajanlar, IFN'lar ve antimikrobiyal peptitler ile ilgili denemeler bulunmaktadır.

Türkiye, sahip olduğu su kaynakları, coğrafi konumu, balık üretimine artan büyük ilgi, artan uluslararası balık ticareti, gerek balık kuluçkahanelerinde uygulanan biyogüvenlik önlemleri ve gerekse yetiştirme işletmelerindeki profesyonelleşmelerin çıktısı olarak dünya levrek üretiminde % 42'lik bir katkı ile hem Avrupa, hem tüm dünya genelinde levrek yetiştiriciliği açısından stratejik bir konuma sahiptir. Türkiye'de tüm balık türleri içinde levrek üretimi ise yine % 32,8 gibi yüksek bir orana sahiptir. Türkiye, sahip olduğu bu değerler çerçevesinde önemli düzeyde yavru, pazar boyu veya işlenmiş levrek ihracatı yaparak GSMH'ya önemli katkılar sağlamaktadır. Yetiştirme amacıyla yurtdışına levrek ihracatı yapıldığında, ithalat yapan ülkeler, balıkların VNN negatif olmasını ve bunun da yetkili bir laboratuvarından belgelenmesini istemektedirler.

VNN hastalığının, OIE ve ADNS gibi hayvan hastalıkları bildirim sistemlerinde ihbarı mecburi bir hastalık olmamasından dolayı ülkelerin epidemiyolojik durumlarının değerlendirilmesinde güçlükler yaşanmaktadır. Ancak virus ile ilgili literatür bilgileri incelendiğinde, hastalığın akdeniz havzasında endemik düzeyde olduğu değerlendirilmektedir. Üretim kapasiteleri karşılaştırıldığında, Türkiye sahip olduğu 427 yetiştirme tesisi ve yüksek üretim hacmine rağmen, hastalık diğer ülkelere göre yok denecek kadar azdır. Tez çalışması öncesinde virus, Türkiye'de klinik olarak üç kez, tarama çalışmaları sırasında ise iki kez tespit edilmiştir.

Bu tez çalışması, Türkiye ekonomisinde önemli yer tutan levrek yetiştiriciliğinde en önemli hastalık durumundaki VNN hastalığının durumunun ortaya konulması, hastalık ile ilgili olarak sahadaki var olan farkındalığın artırılması ve ileride oluşabilecek salgınlar ile ilgili olarak mücadele stratejilerinin geliştirilmesi, ayrıca virus ile ilgili olarak ta genetik yapısının ve diğer ülkelerde bulunan virusların genetik yapıları ile farklılıkları ve ilişkilerinin ortaya konulması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, Türkiye'de faaliyette olan tüm levrek kuluçkahaneleri ve epidemiyolojik temelli olarak modellenen 418 yetiştirme işletmesinin bazılarında betanodavirus varlığı araştırılmıştır. Tez çalışmasında ayrıca, qrtRT-PCR testi optimize edilmiştir.

Balık hastalıkları Ulusal Referans Laboratuvarı'nda, hücre kültüründe virus izolasyonunu takiben Nested-PCR metodu kullanılarak yapılan VNN teşhisi en az 2-3 haftalık zaman alarak, teşhis süresinin uzamasına sebep olmaktadır. Bu durum teşhis maliyetlerini ve işgücünü artırarak, hem saha araştırmalarını zorlaştırmakta hem de rutin teşhisin istenilen zamanda sonuçlanmasına engel olmaktadır. Tez çalışması kapsamında, OIE tarafından önerilen Real Time RT-PCR testi optimize edilerek hem kantitatif verilerin sağlanması mümkün olmuş hem de teşhis süresi 1 güne kadar indirilmiştir. Bu sayede sahanın beklediği analizler de daha kısa zamanda sonuçlandırılmaya başlanmıştır. Ayrıca, testin optimizasyonu ile birlikte gerçekleştirilen validasyon çalışmaları ile, referans laboratuvarında VNN teşhisi TÜRKAK akreditasyon kurumu tarafından onaylanarak akredite bir metot olarak laboratuvara kazandırılmıştır. Tez çalışması, referans laboratuvara betanodavirus teşhisinin daha kısa sürede yapılması ile hem levrek ihracatında gerekli olan sonuçlar kısa sürede ve akredite olarak sunulabilecek hem de ileride olası VNN salgınlarına kısa sürede teşhis ile katkı sağlayacaktır. VNN, uluslararası ticarete önem taşımakta, yumurta, larva, fry veya fingerling ticaretinde hastalığın ari olması istenmektedir. Ülkemizde de yavru levrek ihracatı bulunmakta ve dönemsel olarak VNN hastalığından ariliklerine ilişkin olarak test yaptırmakta ve bu testler ihracatı önemli olarak etkilemektedir.

VNN etkeni betanodavirusların kantitatif tespit edilmesine yönelik bazı çalışmalar bulunmaktadır. Baud ve ark. (2015), tarafından RNA1 segmentine göre geliştirilen qrtRT-PCR testi ile plazmid DNA'sından 50-100 kopyaya kadar, hücre kültüründe ise $10^{2.5}$ – $10^{2.85}$ DKID₅₀'e kadar minimum tespit limiti elde etmişlerdir. Panzarini ve ark. (2010), ise RNA2 segmentine göre geliştirdikleri qrtRT-PCR testi ile plazmid DNA'sından 300 kopyaya kadar, hücre kültüründe ise 10^1 DKID₅₀ minimum tespit limiti elde etmişlerdir. Plazmid DNA'sından elde edilen pozitif sinyallerin daha düşük kopyalarda da elde edilmesine rağmen, ≥ 36 Ct'lerden sonra non spesifik pozitifler elde edildiğinden tespit limiti 300 kopya olarak belirlenmiştir. Tez çalışmasında lineer tespit aralığı $3-2,82 \times 10^{10}$ olarak belirlenmiş ve Panzarini ve ark. (2010), tarafından geliştirilen test ile uyumlu bulunmuştur. Tespit limitinin daha düşük kopya olmasının sebebi ise iki testte kullanılan matrislerin farklılığından

kaynaklanmaktadır. Dalle Valle ve ark. (2005), tarafından geliştirilen SYBER green I temelli, hem RNA1 ve hem RNA2 segmentini amplifiye eden qrtRT-PCR testlerinde ise her iki segment için 10^1 kopyaya kadar tespit elde edilmiştir. Ancak geliştirilen bu testlerin tespit limitlerinin düşük gibi görünmesine rağmen, analitik sensitivite ve RNA1 için -3.62 slope ve % 88.6 verimlilik değerleri ile oldukça düşüktür. RNA2 segmenti için ise -3.32 slope ve % 100 verimlilik ile yeterli düzeydedir. Ancak tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik ile ilgili olarak test içi CV değerleri RNA1 için % 0,2-6,3 (ortalama % 1,4); RNA2 için % 0,48-5,6 (ortalama % 1,5); testler arası CV değerleri ise RNA1 için % 0.02–2.3 (ortalama % 2,4); RNA2 için % 0.26–5.4 (ortalama % 2,3) olarak oldukça düşük düzeydedir. Baud ve ark. (2015), RNA1 segmentini hedef alan qrtRT-PCR testinde test içi CV % 0.05-1.1; testler arası CV ise % 0.43-1.78 olarak, Dalla Valle ve ark. (2005), CV değerlerinden daha iyi düzeydedir. Panzarin ve ark. (2010), tarafından geliştirilen ve optimizasyon testi olan Real Time RT-PCR validasyonunda testler içi CV % 0.02- 2.87; testler arası CV ise % 1.11- 3.48 arasında bulunmuştur. Ayrıca testin verimliliği 2,03 olarak hesaplanmıştır. Tez çalışmasının validasyon parametreleri literatür ile karşılaştırıldığında Baud ve ark. (2015), RNA1 hedefli, Dalla Valle ve ark. (2005), ise SYBER green I temelli olduğundan karşılaştırmanın uygun olmadığı değerlendirilmektedir. Ancak optimizasyon testi olan Panzarin ve ark. (2010), ile karşılaştırıldığında, 10 kopya minimum tespit limiti; -3,373 slope değeri; 1,97 verimlilik; test içi % 0,03-4,58; testler arası % 0,12-2,18; tüm testlerin ise % 0,84 ortalama değişim oranı ile sensitiv, spesifik, tekrarlanabilir ve tekrar üretilebilir bir test olduğu değerlendirilmiştir.

Tez çalışmasının saha araştırmaları aşamasında betanodavirusun hem levrek yetiştirme işletmelerindeki durumunun, hem de kuluçkahanelerdeki durumunun üretimin tüm aşamalarında ortaya konulması amacıyla epidemiyolojik temelli örnekleme metodu kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Yetiştirme işletmeleri için, Türkiye’de faaliyet gösteren 418 yetiştirme işletmesi % 95 güven aralığı, % 100 sensitivite ve % 15 tahmini prevalans dikkate alınarak 20 işletme belirlenmiş, ancak olası aksaklıklar hesaba katılarak 24 işletme örneklendirilmiştir. Kuluçkahane örneklemesinde ise, üretimin tüm aşamalarını kapsayacak şekilde faaliyette olan tüm

kuluçkahaneler % 99,9 güven aralığında örneklenmiştir. İşletmelerden veya kuluçkahanelerde her yaş grubundan örneklenecek balık sayısının belirlenmesinde ise OIE tarafından önerilen surveylans tablosuna göre % 10 prevalans, % 100 sensitivite ve spesifite hesabına uygun gelen 30 örnek sayısı alınmıştır (Anonim, 2015). Bu amaçla levrek yetiştirme işletmelerinden farklı büyüklükte 30'ar adet balık tesadüfi örnekleme yöntemi ile alınmıştır. Aynı şekilde kuluçkahanelerden de döllenmiş yumurta, 0-5 günlük prelarva, 5-40 günlük postlarva, 40-80 günlük fry ve 80-120 günlük fingerling boy olmak üzere her yaş grubundan en az 30 adet yavru levrek örnekleme yapılmıştır.

Kuluçkahanelerde yapılan çalışmalarda, her grup 10-30 örnekten oluşmak üzere, 8 kuluçkahaneden 15 grup döllenmiş yumurta, 9 kuluçkahaneden 14 grup prelarva, 13 kuluçkahaneden 22 grup postlarva, 13 kuluçkahaneden 43 grup fry ve 9 kuluçkahaneden 41 grup fingerling olmak üzere toplam 135 çalışma grubu oluşturulmuş ve toplamda 2460 örnek araştırmada kullanılmıştır. Mevsimsel dağılımlar incelendiğinde 38 grup Aralık-Ocak-Şubat aylarında; 77 grup Mart-Nisan-Mayıs aylarında, 21 grup ise Haziran-Temmuz ve Ağustos aylarında örneklenmiştir. Örneklemelerin yapıldığı kuluçkahanelerde su ısıları, döllenmiş yumurta tanklarında 15 °C, prelarva tanklarında 15-16 °C, postlarva tanklarında 16-20 °C, fry tanklarında 16-22 °C, fingerling tanklarında ise 20-24 °C olarak ölçülmüştür. qrtRT-PCR testleri sonucunda 16 kuluçkahaneden, 1 tanesinde, fingerling boy levreklerde üç çalışma grubunda da VNN virusu tespit edilmiştir.

Prevalansın belirlenmesinde, kuluçkahanelerde yetiştirilen yavru levreklerin yaş gruplarına bakılmaksızın, virusun herhangi bir yaş grubunda tespit edildiği kuluçkahane mihrak olarak değerlendirilmiştir. Buna göre faaliyetteki 16 kuluçkahaneden 1 tanesinde virus tespit edildiğinden, Türkiye genelinde kuluçkahanelerdeki betanodavirus prevalansı % 6,25 (1/16) olarak hesaplanmıştır.

VNN virusunun tespiti ve moleküler karakterizasyonu üzerine dünyada pek çok çalışma bulunmasına rağmen, epidemiyolojik haritaların oluşturulması için yeterli çalışma bulunmamaktadır. OIE listesinde veya ülkelerin hastalık bildirim

mevzuatlarında ihbarı mecburi bir hastalık olmamasından dolayı ülkesel prevalans ve insidans bilgilerine ulaşılamamaktadır. Bunun yanında, epidemiyolojik temelli olmamakla birlikte dünyanın farklı bölgelerinde çiftlik veya yabani popülasyonlarda yaygınlık çalışmaları ile % 0,23 - % 88,5 arasında değişen oranlarda pozitiflik saptanmıştır (Barker ve ark., 2002; Gomez ve ark., 2004; Liu ve ark., 2015; Sakamoto ve ark., 2008).

VNN prevalansı ile ilgili olarak literatür bilgileri araştırıldığında, epidemiyolojik prevalansların geniş bir farklılık gösterdiği, ancak güven aralığı, sensitivite veya tahmini prevalans gibi örnek sayısının belirlenmesi parametreleri kullanılmadan basit rastgele usullerle örnek sayıların belirlendiği veya salgınlar sırasındaki hedefli basit örneklemeler ile prevalansların hesaplandığı görülmektedir (Barker ve ark., 2002; Berzak ve ark., 2019; Gomez ve ark., 2004; Liu ve ark., 2015; Sakamoto ve ark., 2008). Tez  alışması, tüm yaş gruplarının bir arada araştırılması açısından değerlendirildiğinde, tüm dünya genelinde özgün bir çalışma olarak değerlendirilmektedir. Tez  alışması ile hem yetiştirme işletmeleri hem kuluçkahanelerdeki tüm yaş grupları bir arada araştırılarak virus-yaş duyarlılığı ile ilgili verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

Tez  alışması, kuluçkahanelerde yetiştirilen tüm yavru levrek yaş gruplarını kapsamaktadır. Literatür bilgilerinde de değinildiği gibi, virus özellikle fingerling boy balıkları etkilemekle birlikte tüm yaş gruplarında da ölümlere neden olabilmektedir. Buradaki amaç, virusun yaş duyarlılığını da ortaya koymaktır. Deneysel enfeksiyonlarla yaş duyarlılığının çeşitli literatürler ile desteklenmesine rağmen, yapılan literatür taramasında virusun yaş duyarlılığı ile ilgili epidemiyolojik temelli araştırmalara rastlanmamıştır. Tez çalışmasında, halihazırda mevcut tüm levrek kuluçkahanelerinde bulunan tüm yaş gruplarında en az bir pozitif örnek tespit edebilme temelinde yapılan epidemiyolojik tez çalışmasında, literatür bilgileri ile uyumlu olarak sadece fingerling boy balıklarda virus tespit edilmiştir.

Türkiye'nin de içinde yer aldığı Akdeniz havzasında endemik olarak bulunan RGNNV genotipinin optimum gelişme sıcaklığının 25-30  C olduğu bildirilmektedir.

Tez çalışmasında kuluçkahanelerden sağlanan örneklerin su sıcaklıkları incelendiğinde, RGNNV genotipinin optimum gelişme sıcaklığından düşük oldukları görülmektedir. Ancak, kuluçkahanelerde yapılan araştırmanın asıl amacı, yavruların sağlandığı anaçlarda persiste olarak bulunabilecek virusun vertikal geçişinin ve eğer varsa işletme suyunda bulunabilecek virusun yavrularda tespit edilmesidir. Sonuçlar değerlendirildiğinde virus, döllenmiş yumurta, prelarva, postlarva ve fry boy balıklarda tespit edilmemiştir. Bu durum anaçlarda persiste virus enfeksiyonu olmadığını desteklemektedir. Kuluçkahanelerde kullanılan suyun fiziksel dekontaminasyon yöntemleri değerlendirildiğinde, tesislerin hemen hemen tamamının filtre ve UV yöntemi kullanarak biyogüvenlik önlemlerini uyguladıkları görülmüştür. Virusun inaktivasyonu ve filtreden geçmesini engelleyen bu sistemlerin de, kuluçkahane de kullanılan suyun virustan arı olmasına yardım ettikleri değerlendirilmektedir. Fingerling boyuna kadar olan bu yavru levreklerin yetiştirilmesinde bahsedilen steril suyun kullanılması, virusun bu boy balıklarda tespit edilmemesi ile de ilişkili olabileceği değerlendirilmektedir. Kuluçkahanelerde bu biyogüvenlik önlemlerinin alınması virusun tesislere girişine engel olmasına yardım ettiği düşünülmektedir.

Kuluçkahane çalışmasında virus, fingerling boy balıklarda tespit edilmiştir. Fingerling boy balıkların yetiştirme ısılarına bakıldığında, virusun optimum gelişme sıcaklığına yakın olduğu görülmektedir. Bu durum virusun bu boy balıklarda hem daha fazla tespit edilme şansını artırmakta hem de yüksek mortaliteler ile salgınlar meydana getirebilmesi ile açıklanabilmektedir. Ayrıca kuluçkahanelerin fingerling yetiştirme ünitelerinde kullandıkları suyun, 120. günden sonraki aşamada veya yetiştirme işletmelerine gönderilmeden önceki dönemde, balıkların denize adaptasyonunun sağlanabilmesi amacıyla; çoğunlukla herhangi bir sterilizasyon işlemine tabi tutulmadan denizden doğrudan temin edildiği değerlendirilmiştir. Bu durum balıkların sonraki aşamada deniz suyuna adaptasyonunun kolaylaştırırsa da, deniz suyunda var olabilecek virusun balıklara geçişine imkan tanımaktadır. Tez çalışmasında toplam 16 kuluçkahane bulunmaktadır ve 9 tesisten fingerling boy balık örneklenmiştir. Dokuz kuluçkahaneden ise sadece 1 tanesi RGNNV genotipinin optimum gelişme sıcaklığında bulunmaktadır. Kuluçkahanelerin yetiştirme

dönemleri göz önüne alındığında, çoğu tesisin fingerling dönemini virusun aktif olduğu yaz sıcaklıklarına senkronize etmedikleri görülmektedir. Fingerling balıkların yetiştirme dönemlerine bakıldığında, tez çalışmasında örneklerin elde edilme zamanlarının virusun aktif olduğu ve optimum üreme ısısına yakın olduğu yaz dönemlerinde daha az olduğu görülmektedir.

Kuluçkahanelerde durumun daha iyi anlaşılması için yapılan retrospektif araştırmada, virusun tespit edildiği K-1 kuluçkahanesinin K-12 kuluçkahanesi ile ilişkili olduğu ve anaçlardan sağlanan döllenmiş yumurta ve prelarvaların 1-2 günlük yaştan sonra K-1 kuluçkahanesine gönderildiği öğrenilmiştir. Tez çalışmasında K-12 kuluçkahanesinin 1. ve 2. örneklemeğinde virus tespit edilememiştir. Bu durum persiste enfeksiyon olmadığı görüşünü desteklemektedir. Ayrıca K-1 kuluçkahanesinde prelarva, postlarva ve fry, boy levreklerde de virusun tespit edilmemesi persiste enfeksiyonun olmadığı tezini daha da güçlendirmektedir.

Tüm bu bilgiler ışığında kuluçkahane de tespit edilen betanodavirusun, anaç kaynaklı olmadığı, deniz suyu kaynaklı olabileceği değerlendirilmektedir. Ayrıca Türkiye’de çok fazla levrek yetiştirme işletmesi olmasından dolayı aktif olan 16 kuluçkahane de deniz suyunun doğrudan kullanılmadığı aşamalarda virusun tespit edilmemesi, biyogüvenlik ve yetiştirme önlemlerinin alındığının ve bilinçli üretim yapıldığının göstergesidir.

Yetiştirme işletmelerinde virus yaygınlığının tespiti amacıyla gerçekleştirilen epidemiyolojik modelleme ile Türkiye’de faaliyette olan 418 levrek işletmesinin 24 tanesinden, herbirinden tüm boyları temsil edecek şekilde 30’ar adet olmak üzere toplam 720 örnek alınarak 80 çalışma grubunda betanodavirus araştırılmıştır. Örnekleme zamanları incelendiğinde, işletmelerin tamamı virusun aktif olduğu Ağustos ve Eylül aylarında örneklenmiştir. Prevalansın belirlenmesinde, işletmelerdeki levreklerin yaş gruplarına bakılmaksızın, virusun herhangi bir yaş grubunda tespit edildiği işletme mihrak olarak değerlendirilmiş ve qrtRT-PCR testleri sonucunda 24 işletmeden, 1 tanesinde VNN virusu tespit edilmiştir. Ancak prevalansın hesaplanmasında ilk başta belirlenen 20 işletme sayısı baz alınmış,

Türkiye genelinde levrek işletmelerinde betanodavirus prevalansı % 5 (1/20) olarak hesaplanmıştır.

Yetiştirme işletmesinde yapılan araştırmada, levreklerin fingerling boy balıklara çok yakın yaşta olduğu ve kuluçkahanede tespit edilen virus tespit edilen işletmenin, virus tespit edilen K-1 kuluçkahanesi ile ilişkili olduğu ve bu kuluçkahaneden çıkan fingerling boy levreklerin Y-23 işletmesine geldiği belirlenmiştir. Ayrıca virusun tespit edildiği levreklerin çok küçük boy olduğu ve fingerling boy balıklara çok yakın yaşta, yaklaşık 150-160 günlük olduğu tespit edilmiştir. İşletme ile ilgili yapılan daha sonraki araştırmalarda, işletmenin tam bir deniz işletmesi olmadığı, kuluçkahaneden diğer yetiştirme işletmelerine gönderilmek üzere balıkların bekletildiği kuluçkahane sonrası ara bir işletme olduğu, orta veya büyük boy balık olmadığı da belirlenmiştir. Sonuç olarak K-1 ve Y-23 örnekleme ünitelerinin aynı levrek üretim firmasına ait ve aynı lokalizasyonda oldukları belirlenmiştir.

Betanodaviruslar Akdeniz havzasında pek çok kez tespit edilmiştir ve bölgede endemik olarak bulunmaktadır (Anonim, 2017a; Berzak ve ark., 2019; Costa ve Thompson, 2016; Munday ve ark., 2002; Toffan ve ark., 2017). Virusun akuatik çevrede uzun süre canlı kalabileceği ve deniz suyunun iştiraklı olduğu larva veya fry boy levreklerin horizontal bulaşma ile virusa maruz kalabileceği bildirilmiştir (Nerland ve ark., 2007). Tez çalışmasında tespit edilen virusun epidemiyolojisi incelendiğinde kuluçkahanelerden yapılan hiçbir örneklemede döllenmiş yumurta, prelarva, postlarva veya fry boy balıklarda virus tespit edilmemiştir. Kuluçkahane veya yetiştirme işletmesinden tespit edilen virus ise deniz suyunun kullanıldığı, kapalı sistemin dışında kalan ünitelerdir. Bir bütün olarak değerlendirildiğinde virusun vertikal kaynaklı bulaşması ile ilgili bir tespit bulunmamaktadır. Bu durum örneklerin elde edildiği anaçların da virus açısından ari olabileceği hipotezini doğrulamaktadır. Tespit edilen virusun ise, bölgenin endemisinden kaynaklı olarak horizontal bulaşma ile deniz suyu kaynaklı olabileceği değerlendirilmektedir.

Virusun tespit edildiği Y-23 işletmesine yakın olan Y-24 işletmesinde örnekleme zamanında su sıcaklığı, virusun optimum gelişme ısısına yakın olarak 28-30 °C aralığına olmasına rağmen virusun tespit edilememesinin örneklenen balıkların yaşı ile ilgili olabileceği değerlendirilmektedir. Levreklerin, betanodaviruslara en duyarlı olduğu yaş grubunun, bütün yaş gruplarında virus tespit edilebilmesine ve hastalık oluşturabilmesine rağmen en çok fingerling boy balıklar olduğu bildirilmektedir. Y-24 işletmesinden elde edilen balıkların 28-30 cm ve 265-310 g ağırlığında, pazar boyuna yakın oldukları tespit edilmiştir. Bu yaş grubunda virus tespit edilebilmesine rağmen, virusun optimum üreme gösterdiği fingerling boy balıklardan oldukça büyük oldukları görülmektedir. Yine su ısısının 27-28 °C aralığında olduğu Y-22 işletmesinden elde edilen balıkların 12-13,5 cm ve 21-31 g aralığında oldukları tespit edilmiştir. Y-22 işletmesinde balık boylarının, virus duyarlılığına biraz daha yakın olmasına rağmen virusun tespit edilmemesi, bölgede virus sirkülasyonu olmayabileceği ile ilişkilendirilebilir. Türkiye'deki levrek yetiştirme işletmelerinin lokalizasyonları incelendiğinde büyük çoğunluğunun Muğla-Milas ve Bodrum'da bulunduğu bilinmektedir. Tez çalışmasının örnekleme aşamasında işletmelerin rasgele seçilmesine rağmen, bu lokalizasyonla paralel işletme sayısı elde edilmiştir. Çalışmada toplam 24 işletmeden 12'sinin Milas veya Bodrum lokalizasyonlu olduğu görülmektedir. Bu bölgeden örneklenen balıkların, 12-45 cm ve 26,4-950 g ağırlığında olup, neredeyse işletmelerde yetiştirilen balıkların tüm boylarını temsil edecek şekilde varyasyon gösterdikleri tespit edilmiştir. Milas-Bodrum bölgesinde örneklemenin yapıldığı Ağustos-Eylül aylarında deniz suyu sıcaklığının 25-27 °C olduğu ve virusun optimum gelişme ısısına yakın olduğu görülmektedir. Bu bölgede hemen her yaş grubundan örnekleme yapılmasına rağmen virusun tespit edilememesi, bölgede de virus sirkülasyonunun olmayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca Bodrum ve Milas bölgesinin yıllık su ısılarının sadece Ağustos-Eylül aylarında 25-27 °C'ye ulaştığı, diğer aylarda virusun optimum gelişme ısısından daha düşük seyrettiği değerlendirilmektedir. Hem her yaş grubundan hem de uygun örnekleme zamanında virus tespit edilmemesi bu tezi güçlendirmektedir. Yetiştirme işletmelerinin tamamı değerlendirildiğinde, Bodrum ve Muğla bölgesinin su ısısının virusun tespit edildiği bölge ve diğer bölgelerden daha düşük olduğu görülmektedir (Anonim, 2013).

Türkiye’deki VNN vakalarının epidemiyolojisi incelendiğinde, ilk izolasyon 2011 yılı sonunda Mersin ilindeki klinik olarak tanımlanmış ve yoğun mortalitelerin görüldüğü bir yetiştirme işletmesinden sağlanan örneklerde gerçekleştirilmiştir (Özkan Özyer ve ark., 2014). Hastalık tarama çalışmalarında, 2012 ve 2014 yıllarında kuluçkahane taraması sırasında, klinik herhangi bir belirti göstermeyen levrek ve çipuralarda virus tespit edilmiştir. Hastalık izleme çalışmalarında, 2014 yılında ise virus tespit edilen kuluçkahane ile ilişkili bir yetiştirme tesisinde % 10 mortalite ile beraber VNN klinik belirtileri gösteren yavru levreklerde virus tespit edilmiştir. Yine 2014 yılında başka bir kuluçkahanede % 5 mortalite ile beraber VNN klinik belirtileri gösteren yavru levreklerde virus tespit edilmiştir (Kalaycı ve ark., 2016). Tez çalışmasında virus tespit edilen işletme ve kuluçkahanede de VNN hastalığına ilişkin olarak herhangi bir klinik semptom veya yoğun mortalite bildirilmemesi ve levreklerin makroskopik laboratuvar muayenesinde lezyon saptanmaması, ayrıca virus tespitinden sonra yapılan tarama ve izleme çalışmalarında virusun tekrar tespit edilmemesi, aktif bir enfeksiyonun olmadığına göstergesidir.

Tez çalışmasında elde edilen Türkiye betanodavirus izolatları olan TR.VNN.01.01 ve TR.VNN.01.02, ilk tespit edildiği qrtRT-PCR testinde zayıf pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif örneklerin direkt doku homojenizatlarından yapılan qrtRT-PCR testinde, Ct değerleri ve viral yükleri TR.VNN.01.01 izolatı için 32,19 ve $3,10 \times 10^2$ kopya/ μ l; TR.VNN.01.02 izolatı için ise 31,56 ve $4,82 \times 10^2$ kopya/ μ l olarak hesaplanmıştır. Hücre kültüründe virus izolasyonundan sonra ise sırasıyla 20,96 Ct ve $7,29 \times 10^5$ kopya/ μ l; 24,87 Ct ve $4,83 \times 10^4$ kopya/ μ l değerleri elde edilmiştir. Hücre kültüründe virus izolasyonu çalışmaları sonrasında tekrar edilen testlerde Ct değerlerinin ve viral yüklerinin arttığı görülmektedir. Viral yüklerin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda Baud ve ark. (2015), tarafından RNA1 segmentine göre geliştirilen qrtRT-PCR testi ile plazmid DNA’sından 50-100 kopyaya kadar, hücre kültüründe ise $10^{2.5}$ – $10^{2.85}$ DKID₅₀ minimum tespit limiti elde etmişlerdir. Panzarin ve ark. (2010), ise RNA2 segmentine göre geliştirdikleri qrtRT-PCR testi ile plazmid DNA’sından 300 kopyaya kadar, hücre kültüründe ise 10 DKID₅₀ minimum tespit limiti elde etmişlerdir. Ancak iki çalışmada da tespit edilen

viral yüklerin, enfektif viral yükün belirlenmesinden ziyade, klinik enfekte, persiste veya subklinik olarak sadece virusun nükleik asidinin tespitine yönelik oldukları görülmektedir. Dalla Valle ve ark. (2005), tarafından SYBER green I temelli rtRT-PCR metodunun geliştirilmesi çalışmasında yapılan deneysel enfeksiyonlarda, 20-90 g'lık levreklerde 7. günden sonra klinik belirtiler görülmeye başlamış ve 7. günde balık örneklerinden elde edilen RNA kopya sayıları RNA2 için 2.01×10^9 ; RNA1 için ise 2.95×10^7 olarak hesaplanmıştır. Levreklerdeki deneysel enfeksiyonda, beyin örneklerinde $10^{6.55}$ DKID₅₀ ve RNA2 için 8.96×10^8 kopya; RNA1 için ise 1.21×10^7 kopyaya kadar klinik belirtilerin oluşmadığı, klinik belirtiler ve ölümlerden sonra canlı kalan ve klinik belirti göstermeyenlerin ise $10^{4.55}$ DKID₅₀ ve RNA2 için 1.29×10^7 kopya; RNA1 için ise 6.25×10^5 kopya viral yük taşıdıkları belirlenmiştir. VNN 120'den fazla balık türünde ve genel olarak kabul edilen dört genotip ile hastalık meydana getirmektedir (Iwamoto ve ark., 2000; Mori ve ark., 2003; Toffan ve ark., 2017). Ancak her genotipin veya aynı genotipin farklı coğrafyalardaki izolatlarının farklı balık türleri üzerindeki patojeniteleri farklılık göstermektedir (Vendramin ve ark., 2014). Betanodaviruslar ile ilgili patojenite denemeleri ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Var olan birkaç çalışmada ise DKID₅₀'si belirlenen virus deneysel enfeksiyonlarda kullanılmış ancak, in vivo olarak enfeksiyonu başlatma dozunun belirlenmesine yönelik dilüsyonlu çalışmalar yapılmamıştır. Gerek virusun diğer viruslara göre oldukça yeni bir virus olması, gerekse farklı genotiplerinin bulunması ve çok fazla balık türünde farklı enfektif özellikte olmasından dolayı, tür bazında spesifik genotipin enfektif viral yükünün belirlenmesine yönelik DKID₅₀'si bilinen, farklı dilüsyonlarının kullanıldığı qrtRT-PCR destekli deneysel enfeksiyon çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak deneysel enfeksiyonlarda kullanılan DKID₅₀ oranları değerlendirildiğinde $10^{4.55}$ (Dalla Valle ve ark., 2005), 10^4 (Vendramin ve ark., 2014) virus partikülünün kullanıldığı görülmektedir. Tez çalışmasında elde edilen izolatların viral yükleri düşük olduğundan titrasyon için gerekli olan E-11 hücre hattında ilk izolasyonları yapılamamıştır. Virusun ilk izole edildiği SSN-1 hücre hattı ise izolasyonu sağlamakla birlikte, titrasyon için uygun olmadığından elde edilen virusların titrasyonu yapılamamıştır. Bununla birlikte elde edilen viral yük miktarlarının $3,10 \times 10^2$ ve $4,82 \times 10^2$ oldukları değerlendirildiğinde enfeksiyon oluşturma miktarlarının yeterli olmadığı düşünülmektedir. Bu hipotezi,

iki izolatın elde edildiği balıklarda herhangi bir hastalık tablosunun olmaması, işletme veya kuluçkahanelerinde VNN ile ilişkili yüksek mortalitelerin olmaması bilgileri desteklemektedir.

Tez çalışmasında tespit edilen betanodavirusların genotiplendirilmesi amacıyla yapılan kısmi genom analizinde, RGNNV genotipi oldukları belirlenmiştir. RGNNV genotipi Akdeniz havzasında daha önceden İtalya, İspanya, Portekiz, Cezayir, Güney Kıbrıs, İsrail, Tunus, Hırvatistan ve Yunanistan'da da tespit edilmiştir. Tez izolatları, RNA1 segmentinin kısmi genom analizine göre en çok % 99,21 ile Güney Kıbrıs'ta levreklerden izole edilen betanodavirus ile benzerlik göstermiştir. Daha sonra ise % 98,74 ve % 98,62 oranında İtalya'da tatlı su levrekleri ve Yunanistan'da çizgili lahozlardan izole edilen betanodaviruslar ile, kendi aralarında ise % 99,77 benzerlik göstermiştir. RNA2 segmentinin kısmi genom analizine göre ise en çok % 99,58 Güney Kıbrıs, 99,37 Yunanistan ve 99,15 İtalya izolatları ile, kendi aralarında ise % 100 benzer bulunmuştur.

İki segment birlikte değerlendirildiğinde kısmi dizilerine göre RNA1 segmentinin, RNA2 segmentine göre mutasyona daha yatkın olduğu görülmüştür. RNA1'deki bu durum virusun evrimsel değişimlerinin irdelendiği çalışmalarla da ortaya konulmuştur (Panzarin ve ark., 2012). Virusun farklı sıcaklıklara adaptasyonundan sorumlu olan RNA1 segmentindeki nt değişimlerinin, SJNNV, BFNNV ve TPNNV genotipleri ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak % 26-38 arasında olduğu görülmektedir. RGNNV izolatlarının RNA1 segmenti nt değişimleri ise birkaç izolat dışında % 5 ve altı seviyededir. Nt değişiminin % 10 civarında olduğu üç Akdeniz izolatı ise 1996-2000 yıllarında izole edilen viruslar olup, aynı havzaya ait bu viruslar ile tez viruslarının bu kadar farklı olması, 16-20 yıl küresel ısınmaya bağlı deniz suyu ısısındaki değişim olarak açıklanabilir. Akdeniz deniz suyu yıllık ortalama sıcaklığını yıllara göre analizi yapıldığında, 1996 yılında 21 °C, 2016 ve 2017 yıllarında ise 22,1-22,3 °C (Anonim, 2019) olması bu hipotezi desteklemektedir. İki tez izolatı arasında RNA2 segmentine göre % 100 nt yakınlığı ile RNA1 segmentinin % 99,77 nt yakınlığı; iki farklı izolatın örnekleme tarihlerindeki farklılık ile açıklanabilir. TR.VNN.01.01 izolatı Eylül 2016'da,

TR.VNN.01.02 izolatı ise Mayıs 2017’de örneklenmiştir. Eylül 2016’dan Mayıs 2017’ye kadarki dönemde su ısısında meydana gelen değişiklikler, virusun farklı ısılara adaptasyonunu sağlamak amacıyla RNA1 segmentinde nokta mutasyonlara neden olabileceği düşünülmektedir.

Tez örneklerinin genotiplendirilmesi amacıyla hem RNA1, hem RNA2 segmentlerinin kısmi genom dizi analizleri ile RGNNV genotipinin belirlenmesinden sonra, RGNNV tüm genom dizilerinin elde edilmesi amacıyla hem RNA1, hem RNA2 segmenti ayrı ayrı ampifiye edilerek tüm genom diziler elde edilmiştir. Filogenetik çalışmalar, RNA1 segmentinde Protein A, RNA2 segmentinde kapsid proteini üzerinde yapılmıştır. Protein A tüm genom nükleotid dizilerine göre, tez çalışmasında bulunan RGNNV genotipindeki iki yerli izolatın nükleotid benzerlikleri kendi aralarında % 99,83 olarak bulunmuştur. TR.VNN.01.01 izolatının Protein A tüm genom nükleotid dizilerine göre, en yakın olduğu izolat ise % 98,75 ile İtalya’da levreklerden, daha sonra ise % 97,46 Tayvan, % 97,27 Singapur; % 97,06 Japonya; % 97,05 Çin ve Hindistan izolatları ile benzer bulunmuştur. Tez izolatlarının kendi aralarında 7, en yakın olduğu onbir RGNNV izolatlarıyla ise 37 nt pozisyonunda farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Protein A (RNA1 ORF) tüm genom aa farklılıkları incelendiğinde, TR.VNN.01.01 ve TR.VNN.01.02 izolatlarının kendi içlerinde aynı, en yakın referans RGNNV izolatları ile ise 789 ve 977. aa pozisyonlarında farklılık gösterdiği ortaya konulmuştur. Protein A’daki diğer aa farklılıkları incelendiğinde, yetiştirme işletmesinden izole edilen TR.VNN.01.01 izolatının, hem kuluçkahaneden izole edilen TR.VNN.01.02 izolatından hem de diğer en yakın referans RGNNV izolatları ile 54, 811 ve 819. aa pozisyonlarında farklılık gösterdiği ortaya konulmuştur.

Protein A’yı kodlayan RNA1 nükleotidlerindeki mutasyonların, farklı genotip betanodavirusların, mitokondriyel lokalizasyon, membran affinitesi, RNA toplanması, stabilite ve Protein A konak hücre etkileşimlerini etkileyerek farklı çevresel koşullar ve farklı sıcaklıklarda replikasyon titrelerini etkileyebileceği ortaya konulmuştur (Panzarin ve ark., 2014). Protein A’nın 1-445 aa pozisyonlarının

sıcaklık sensitivitesinde rol aldığı, farklı sıcaklıkların protein A'nın mitokondriyal membrana transferini etkilediği bildirilmektedir (Hata ve ark., 2010). Su ısısının, virusun replikasyonu için gerekli olan RdRp enziminin aktivitesini etkilediği, bu durum da farklı genotiplerin epidemisi için farklı optimum ısılara gereksinim olduğu bildirilmektedir (Liu ve ark., 2015). Örneğin vahşi tip RGNNV/SJNNV reassortantı, RNA1'in sıcaklığa duyarlı bölgesinde (aa 1-445) altı amino asit değişikliğine sahiptir ve Senegalensis sole'u enfekte edebilmek için 18-22 °C gibi farklı bir sıcaklık aralığı gereklidir, sıcaklığın 16 °C gibi bir seviyeye inmesinin ise virus replikasyonunu azaltarak mortalitelerin % 100'den % 8'lere kadar düşürdüğü ortaya konulmuştur (Souto ve ark., 2015a). Normal şartlar altında RGNNV genotipinin optimum gelişme ısı 25-30 °C'dir. Senegalensis sole, betanodaviruslardan en çok SJNNV genotipine duyarlıdır ve SJNNV genotipi optimum gelişme ısı 20-25 °C'dir. Ancak RGNNV/SJNNV reassortantı, RNA2 segmenti ile konakçı spesifitesinin sağlanmasıyla enfekte olabilmekte, RNA1'deki mutasyonları ile de virusa uygun sıcaklık ortamı sağlayarak salgınlar meydana getirmektedir.

Tez çalışmasında elde edilen izolatların Protein A'daki sıcaklık adaptasyonunun sağlandığı 1-445 aminoasit dizilimleri incelendiğinde sadece 54. aminoasitte nokta mutasyon olduğu belirlenmiştir. 54. aa, TR.VNN.01.01'de treonin, diğer izolatlarda ise metiyonin; 811. aa, TR.VNN.01.01'de lizin, diğerlerinde asparajin; 819. aa, glisin, diğerlerinde ise triptofan olduğu görülmektedir. 811 ve 819 aa dizilimleri her ne kadar Protein A ORF içinde yer alsalar da, sıcaklık adaptasyonu ile ilgili mutasyonların 1-445 aa'ler arasında meydana geldiği bilinmektedir (Hata ve ark., 2010; Panzarin ve ark., 2014). 1-445 aa'lerdeki mutasyonların RGNNV ve SJNNV genotipleri için en çok 7, 19, 155, 223, 232, 235, 241, 251 ve 254. aa'leri içeren dokuz bölgede olduğu ve bunlardan da fiziksel ve kimyasal olarak etkileyen en önemli değişikliklerin 7, 223, 241 ve 251. aa'leri içeren dört bölgede meydana gelen mutasyonlarda daha anlamlı olduğu bildirilmektedir (Panzarin ve ark., 2014). Tez izolatlarında, değişimin en çok meydana geldiği bu dokuz aa bölgesinin stabil olduğu, referans RGNNV izolatları ile de uyumlu olduğu gözlenmektedir. 1-445 arasında kalan 54. aa değişiminin ise virusun sıcaklık adaptasyonunda rol almakla birlikte majör bir etki yapmadığı değerlendirilmektedir.

Kapsid protein tüm genom nükleotid dizilerine göre, tez çalışmasında bulunan RGNNV genotipindeki iki yerli izolatın nükleotid benzerlikleri kendi aralarında % 99,90 olarak bulunmuştur. TR.VNN.01.01 izolatına en yakın izolatlar ise % 99,20 ile Çin ve Japonya'da grouperlerden, % 98,89 ile Hindistan'da asya levreğinden, Japonya'da grouperlerden ve Çin'de lahozdan, % 98,89 ile İspanya'da kalkan ve levrekten, % 98,79 ile İsrail'de lahozdan, % 98,48 ile Yunanistan'da levrek ve İsrail'de lahozdan, % 98,37 ile İsrail % 98,28 ile Fransa ve % 98,27 ile Yunanistan'da levreklerden izole edilen betanodaviruslar oldukları belirlenmiştir. Kapsid proteini tüm genom aa farklılıkları incelendiğinde, TR.VNN.01.01 ve TR.VNN.01.02 izolatlarının kendi aralarında herhangi bir farklılığının bulunmadığı, iki yerli izolat ile referans izolatlar arasında ise sadece 256. aa pozisyonunda yerli izolatlarda izolöysinini yerini referans izolatlarda valinin aldığı belirlenmiştir.

Nt yakınlıkları değerlendirildiğinde, ilginç olarak en yakın izolatların uzak doğu veya Hint okyanusunda izole edilenlerin olduğu görülmektedir. Benzer durum aynı havza içinde yer almasına rağmen, Batı Akdeniz izolatlarının Doğu Akdeniz izolatlarından daha yakın olması ile de tekrarlanmıştır.

RNA2 tarafından belirlenen konakçı tropizmi ve immunreaktivite gibi çeşitli fenotipik özellikler bazı çalışmalar ile belirlenmiştir (Ito ve ark., 2008; Iwamoto ve ark., 2004; Panzarini ve ark., 2016). Ito ve ark. (2008), tarafından kapsid proteininin 695–765 nt dizilerinin konakçı spesifitesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Panzarini ve ark. (2012), ise farklı konakçı tropizmi için mutasyonların gerekli olmadığını, mutasyonlara ise balık çiftliklerine özgü çevresel ve çiftliksel (stres, yoğunluk, yeni balık girişleri vb.) özelliklerin neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir Ancak aynı araştırmacı (Panzarini ve ark., 2016) antijenik reaktivitede kapsid proteinlerinin rol oynadığını değerlendirirken, RGNNV ve SJNNV genotiplerinin konakçı tropizmi ile ilgili belirleyici bölgelerinin sırasıyla 694-758 ve 695-765 nt dizileri olduğunu dile getirmiştir. RGNNV genotipinin immunoreaktif bölgesi konakçı tropizm dizilerini de içine alan 675-795 nt dizileridir. Bunun aksine SJNNV immunonoreaktif bölge 796-1023 nt pozisyonları ile konakçı tropizm bölgesinden farklılık göstermektedir (Panzarini ve ark., 2016). Başka bir araştırmacı ise kapsid proteininin C-terminalinde

meydana gelebilecek küçük değişikliklerin yeni konakçı kolonizasyonunda rol oynayabileceği bildirmiştir (Oliveira ve ark., 2009). Kapsid proteininin 247 ve 270 aa pozisyonlarının virusun patojenitesinde büyük bir rol oynadığı gösterilmiştir (Souto ve ark., 2015c). Souto ve ark. (2015c) ve Souto ve ark. (2016), RGNNV/SJNNV suşunun 247 ve 270 aa pozisyonlarının (Ser247; Ser270) Senegalese sole ve kalkan'larda virulansın belirlendiği iki bölge olarak tanımlamışlardır. Bu bölgelerin mutasyonu ile yapılan enfektivite denemelerinde mortalitelerdeki belirgin farklar ile bu pozisyonların önemi ortaya konulmuştur (Souto ve ark., 2015b).

Tez çalışmasında elde edilen izolatlar ile referans izolatların kapsid proteini nt farklılıkları incelendiğinde 267. (G;A), 564. (C;T), 766. (G;A) ve 792. (C;T) nt'lerde nokta mutasyonların meydana geldiği, bunlardan da sadece 766. nt değişiminin 256. aa pozisyonunda değişikliğe neden olduğu görölmektedir. Antijenik çeşitlilik veya konakçı tropizminin belirlendiği nt veya aa pozisyonları ile karşılaştırıldığında, izolatlardaki bu değişikliğin bu bölgeler dışında olduğu değerlendirilmektedir. Ayrıca valin-izolöysin değişiminin, iki amino asidin fiziksel ve kimyasal özellikleri birlikte değerlendirildiğinde yan zincirli amino asitler olarak benzer fonksiyonlara sahip olduklarından, mutasyonlarının diğer amino asit değişimlerinden daha az etki yaratabileceği düşünölmektedir

RNA1 ve RNA2 genomlarının evrimsel dinamikleri incelendiğinde, RNA1 tarafından kodlanan viral polimerazın, RNA2 tarafından kodlanan kapsid proteininden daha fazla değişime yatkın olduğu ileri sürölmüştür. Bu durumun da aslında RNA1 tarafından kontrol edilen sıcaklık adaptasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Panzarin ve ark., 2012). Tez çalışmasında elde edilen moleküler epidemiyolojik bilgiler ışığında her iki segment birlikte değerlendirildiğinde bu görüş birçok kez doğrulanmıştır. Sadece iki tez izolatu için genel bir değerlendirme yapıldığında, aynı havza, aynı boy balıklar, ancak sadece farklı örnekleme zamanı ve mevsimde izole edilen muhtemelen de aynı virus; RNA1 segmentinde % 0,17, RNA2 segmentinde ise % 0,10 değişim göstererek bu evrimsel dinamiği desteklemektedir.

qRT-PCR testi ile pozitif tespit edilen örneklerden virus izolasyonu amacıyla hücre kültürlerine ekimler yapılmıştır. Literatür bilgilerinde virus izolasyonu için SSN-1 veya SSN-1'den klonlanan E-11 hücre hattının kullanılabileceği bildirilmektedir (Anonim, 2017a; Frerichs ve ark., 1996; Iwamoto ve ark., 2000). Ancak, SSN-1 hücre hattının tüm fry Stripe snakehead'ten oluşmasından dolayı meydana gelen CPE'lerin nonspesifik olmasının kantitatif analizlerde uygun olmadığı, bunun yerine, E-11'in, kantitatif analizler için daha uygun olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Iwamoto ve ark., 2000). Bu amaçla tez çalışmasında virus izolasyonu için ilk olarak E-11 devamlı hücre kültürüne 1/10 ve 1/100 dilusyonlarda adsorbsiyonlu ve adsorbsiyonsuz yöntemle inokülasyonu yapılmış, ancak ilk pasajlarda herhangi bir CPE gözlenmemiştir. Devamında dokuz kör pasaj daha yapılmış anak yine herhangi bir CPE izlenmemiştir. Ayrıca her pasaj sonunda yapılan qRT-PCR testlerinde de herhangi bir pozitiflik saptanmamıştır. Virus izolasyonun E-11 hücre hattında gerçekleştirilememesinin ardından kantitatif yaklaşımdan vazgeçilerek en azından virusun üretimesi amacıyla SSN-1 hücre hattına 1/10 ve 1/100 dilusyonlarda adsorbsiyonlu ve adsorbsiyonsuz yöntemle inokülasyon yapılmıştır ve adsorbsiyonlu ekimde 4. günden sonra; adsorbsiyonsuz ekimde ise 7. Günden sonra CPE elde edilmiştir. Virusların SSN-1 hücre hattında izolasyonları qRT-PCR testleri ile de konfirme edilmiştir. Virusun SSN-1 hücre hattında izole edilmesinden sonra tekrar E-11 hücre hattına inokülasyon yapılmış ve virus adaptasyonu sağlanarak izolasyon gerçekleştirilmiştir. Benzer durum Sakamoto ve ark. (2008), tarafından, sağlıklı görünümdeki yabani deniz türlerinde VNN tespiti için yapılan epidemiyolojik araştırmada 729 balıktan 87 adeti Nested PCR ile pozitif tespit edilmelerine rağmen, E-11 hücre hattına inoküle edilen pozitif örneklerin hiçbirinde CPE elde edilememiş ve virus üretilmemesi ile tecrübe edilmiştir. Araştırmacılar bu durumu, pozitif bulunan örneklerde ya CPE oluşturmak için yeterli virus titresinin bulunmamasına ya da viral RNA olmasına rağmen sadece virion veya enfektif kapsidinin olmayabileceğine bağlamışlardır (Sakamoto ve ark., 2008). Panzarin ve ark. (2010), tarafından geliştirilen Tagman temelli rtRT-PCR testi validasyonu sırasında hücre kültüründe virus izolasyonu ile rtRT-PCR testi karşılaştırılmış ve ≥ 31 Ct olan örnekler hangi yöntemle inokülasyon yapıldığı bildirilmemekle birlikte, SSN-1 hücre kültüründe üretilmemiştir. Teorik olarak

düşünüldüğünde verilen literatür bilgileri klasik viroloji temeli ile bağdaşmaktadır. Tez çalışmasında da benzer durumla karşılaşılmış, örneklerin tamamı sağlıklı görünümdeki balıklardan elde edilmiş ve ilk olarak elde edilen pozitiflerin Ct değerlerinin düşük olması, düşük virus titresine bağlanmıştır. Örneklerin herhangi bir salgın şüphesi olmayan işletme veya kuluçkahanelerden elde edilmesi, ayrıca otopsi sırasında iç organlar veya daha da önemlisi virusun hedef organları olan beyin, omurilik ve gözde herhangi bir makroskopik patolojik lezyon gözlenmemiştir. Saha ve laboratuvar verilerinin uyumlu olması, virus tespit edilen işletme veya kuluçkahanelerde aktif bir enfeksiyonun olmadığı, bunun sebebinin de düşük viral yük olabileceği tezini doğrulamaktadır. Ancak tez çalışmasında, Sakamoto ve ark. (2008), çalışmasından farklı olarak SSN-1 hücre hattı da kullanılmış ve virus izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu bilgiler ışığında, betanodavirus izolasyonu için her ne kadar virus titrasyonu gibi kantitatif testler için E-11 hücre hattının daha uygun olduğu bildirilse de, persiste veya düşük viral yüklü asemptomatik enfeksiyonlarda virus izolasyonunun ilk basamağı olarak E-11 hücre hattının tercih edilmesinin, virus izolasyonunun yapılamaması gibi olumsuz sonuçlar doğurabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, Türkiye’de ve dünyada ihbari mecburi viral balık hastalığı olmamasına rağmen, önemli ekonomik kayıplara neden olan ve uluslararası balık ve balık ürünleri ticaretinde önemli bir yer tutan VNN etkeni betaodavirusunun epidemiyolojik temelli modelleme ile Türkiye’de faaliyette olan tüm levrek kuluçkahanelerinde farklı yaş gruplarına ait döllenmiş yumurta, prelarva, postlarva, fry ve fingerling boy levrekler ve bazı levrek yetiştirme işletmelerinde küçük, orta ve büyük boy levreklerde yaygınlığının araştırılması ile kuluçkahanelerinin enfeksiyon kapasitesi ve yetiştirme işletmelerinin virus epidemiyolojisindeki rollerinin ortaya konulması, virusun tespiti halinde retrospektif epidemiyolojik çalışmalar ile olası bulaşma kaynaklarının ortaya konulması, epidemiyolojik izlemelerin yapılarak enfeksiyon sürecinin takip edilmesi, virusun tüm yaş gruplarında araştırılması ile enfeksiyonun veya virus varlığının hangi aşamada başladığının ortaya konulması ile yaş duyarlılığının ortaya konulması, tespit edilen izolatlarda moleküler araştırmaların yapılarak izolatlar arası farklılıkların ortaya konulması, filogenetik analizlerin yapılarak bilimsel literatüre katkı sağlaması ve betanodavirus teşhisinde Real Time RT-PCR metodunun kantitatif olarak optimize edilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda gerçekleştirilen tez çalışmasında elde edilen verilere göre;

- 1- OIE tarafından önerilen Real time RT-PCR testi kantitatif olarak optimize edilmiştir. Bu sayede kantitatif verilerin sağlanması mümkün olmuş, teşhis süresi kısalmış, teşhis maliyetleri de azalmıştır.
- 2- Real Time RT-qPCR testinin optimizasyonu ile birlikte gerçekleştirilen validasyon çalışmaları ile VNN teşhisi TÜRKAK tarafından onaylanarak akredite bir metot olarak balık hastalıkları ulusal referans laboratuvarına kazandırılmıştır.

- 3- Teşhis süresinin kısılması ile hem levrek ihracatında gerekli olan sonuçlar daha kısa sürede ve akredite olarak sunulabilecek hem de ileride olası VNN salgınlarına kısa sürede teşhis ile katkı sağlayacaktır.
- 4- Türkiye’de faaliyette olan tüm levrek kuluçkahanelerinde farklı yaş gruplarına ait döllenmiş yumurta, prelarva, postlarva, fry ve fingerling boy levreklerde betanodavirus yaygınlığı araştırılmış ve 16 kuluçkahaneden 1 tanesinde sadece 115 günlük fingerling boy levreklerde virus tespit edilmiş ve kuluçkahanelerde betanodavirus prevalansı % 6,25 olarak hesaplanmıştır.
- 5- Türkiye’de faaliyet gösteren 418 adet levrek yetiştirme işletmesinden epidemiyolojik temelli örnekleme ile 24 işletmede virus yaygınlığı araştırılmış ve sadece 1 işletmede virus tespit edilmiştir. Yetiştirme işletmelerinde betanodavirus prevalansı % 5 olarak hesaplanmıştır.
- 6- Hem kuluçkahane hem yetiştirme işletmesinde tespit edilen betanodavirusların izole edildiği yavru levreklerin sağlıklı görünümde olduğu, örneklendikleri epidemiyolojik ünitelerde herhangi bir mortalitenin olmadığı ve qrtRT-PCR testi ile viral yüklerinin düşük olduğu belirlenmiştir.
- 7- Betanodavirus tespiti sonrasında yapılan retrospektif epidemiyolojik çalışmalarda kuluçkahane ile yetiştirme işletmesinin aynı orijinli ve lokalizasyonlu olduğu ve deniz suyunun direkt olarak kullanıldığı adaptasyon bölümlerinde bulundukları, aynı yerde kapalı sistem içerisinde ve biyogüvenlik önlemlerinin uygulandığı prelarva, postlarva ve fry boy levreklerin yetiştirildiği bölümlerde virus tespit edilmemiştir.
- 8- Bu bilgiler ışığında tespit edilen virusun elde edildiği yavru levreklerde aktif bir enfeksiyon bulunmadığı ve düşük viral yük nedeniyle subklinik enfekte olabilecekleri değerlendirilmiştir.

- 9- Tespit edilen betanodavirusların hücre kültüründe üretilmesi amacıyla ilk önce E-11 hücre hattı denenmiş, ancak izolasyon sağlanamadığından SSN-1 hücre hattı kullanılarak virus izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle özellikle düşük viral yüklü örneklerden virus izolasyonunda her iki hücre hattının da kullanılması gerektiği düşünülmektedir.
- 10- Tez çalışmasında elde edilen izolatların hem RNA1 hem RNA2 segmentine göre, genotiplendirme amacıyla kısmi genom dizileme, moleküler karakterizasyon ve filogenetik çalışmalar için ise tüm genom dizileme çalışmaları yapılmıştır.
- 11- RNA1 protein A tüm genom analizine göre tez çalışmasında elde edilen izolatların en çok İtalya izolatı, ardından Tayvan ve Singapur izolatları ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.
- 12- RNA2 kapsid protein tüm genom analizine göre, tez çalışmasında elde edilen izolatların en çok Çin izolatı, ardından Japonya, İspanya ve İsrail izolatları ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.
- 13- Literatür bilgileri ile uyumlu olarak, RNA1 segmentinin RNA2 segmentine göre mutasyona daha açık olduğu ortaya konulmuştur.
- 14- Kuluçkahanelerde uygulanan biyogüvenlik önlemlerinin virusun su kaynaklı bulaşmasını engellediği değerlendirilmiş olup, kuluçkahaneler ile yetiştirme işletmelerinde uygulanan biyogüvenlik önlemlerinin devam etmesi ve deniz suyunun sanitasyonunun sağlanmadan kullanılmaması gerektiği önerilmektedir.
- 15- Anaçlarda betanodavirus kontrolü ve arılığının sağlanması amacıyla persiste enfeksiyonları tespit edebilen antijen temelli hızlı ELISA testlerinin geliştirilebileceği düşünülmektedir.

- 16- Tespit edilen virusların viral yüklerinin belirlenmesinin yanısıra, enfektif viral yüklerinin belirlenmesine yönelik qrtRT-PCR destekli olarak genotip-konakçı duyarlılığının belirlenmesine yönelik deneysel enfeksiyon içeren çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.
- 17- Yerli izolatların elde edilmesiyle ileride olabilecek salgıların önlenmesine yönelik yerli aşı çalışmalarının yapılabilceği düşünülmektedir.
- 18- Virusun yaban hayatındaki durumu ile ilgili Türkiye’de herhangi bir veri bulunmamaktadır. Tüm denizleri kapsayacak plan dahilinde yabani türlerde virusun tespit edilmesine yönelik çalışmalar yapılması erken uyarı sistemi açısından önem arz etmektedir.
- 19- Bu tez çalışması, hem levrek kuluçkahaneleri hem levrek yetiştirme işletmeleri bir bütün olarak düşünüldüğünde, betanodavirusun tüm yaş gruplarında araştırıldığı özgün bir çalışma olarak karşımıza çıkmaktadır.

ÖZET

Türkiye’de Levrek Kuluçkahaneleri ve İşletmelerinde Viral Nervöz Nekrozis (VNN) Virusu’nun Araştırılması, Epidemiyolojisi ve Moleküler Karakterizasyonu

Bu çalışma, Türkiye’de tüm levrek kuluçkahaneleri ve bazı yetiştirme işletmelerinde, levreklerde önemli viral bir hastalık olan Viral Nervöz Nekrozis (VNN) etkeni betanodavirus yaygınlığının araştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ayrıca, OIE tarafından önerilen Real Time RT-PCR metodunun kantitatif olarak optimizasyonu gerçekleştirilerek analitik sensitivite, lineer tespit aralığı, minimum tespit limiti, spesifite, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik validasyon çalışmaları yapılan VNN teşhisi akredite bir metod olarak Balık Hastalıkları Ulusal Referans Laboratuvarına kazandırılmıştır.

Türkiye’de betanodavirus yaygınlığı faaliyette bulunan tüm levrek kuluçkahanelerinde (n:16) döllenmiş yumurta, prelarva (0-5 gün), postlarva (5-40 gün), fry (40-80 gün) ve fingerling (80-120 gün) olmak üzere tüm üretim aşamalarından ve bazı levrek yetiştirme işletmelerinden (n:20) epidemiyolojik temelli örnekleme ile araştırılmıştır. Bu kapsamda; her grup 10-30 örnekten oluşmak üzere, 8 kuluçkahaneden 15 grup döllenmiş yumurta, 9 kuluçkahaneden 14 grup prelarva, 13 kuluçkahaneden 22 grup postlarva, 13 kuluçkahaneden 43 grup fry ve 9 kuluçkahaneden 41 grup fingerling olmak üzere toplam 135 çalışma grubu oluşturulmuş ve toplamda 2460 örnek kuluçkahane; 720 levrek örneği de yetiştirme işletmeleri araştırmasında kullanılmıştır.

Betanodavirus RNA’sı, bir kuluçkahanede fingerling boylarda ve bir yetiştirme işletmesinde de küçük boy balıklarda sırasıyla $4,82 \times 10^2$, $3,10 \times 10^2$ kopya/µl olmak üzere düşük viral yük ile tespit edilmiştir. Türkiye kuluçkahanelerinde prevalans % 6,25 (1/16); yetiştirme işletmelerinde ise % 5 olarak hesaplanmıştır. Virus SSN-1 hücre kültüründe üretilmiş, vakuolizasyon ve lizis ile karakterize CPE meydana getirmiştir. Virus tespit edilen kuluçkahane ve ilişkili olduğu bilinen kuluçkahanelerde yapılan epidemiyolojik çalışmada virus tekrar tespit edilememiştir. Yetiştirme işletmesinin ise virus tespit edilen kuluçkahanenin devamı niteliğinde olduğu ve aynı lokalizasyonda oldukları belirlenmiştir. Virus, biyogüvenlik önlemlerinin uygulanmadığı deniz suyunun direkt kullanıldığı adaptasyon bölümünde bulunan fingerling boy levreklerde tespit edilmiştir. Tespit edilen virusların hem RNA1 hem RNA2 segmentinin kısmi genom analizinde, Akdeniz havzasında endemik olarak bulunan Redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) genotipi oldukları belirlenmiştir. Genotipi belirlenen pozitif örneklerin hem RNA1 hem RNA2 segmentine göre tüm genom ve filogenetik analiz çalışmaları yapılmıştır. İzolatların RNA1 ORF (Protein A) tüm dizilerinin İtalya, ardından Tayvan ve Singapur izolatları ile; RNA2 ORF (kapsid protein) tüm dizilerinin ise Çin, ardından Japonya, İspanya ve İsrail izolatları ile benzerlik gösterdiği ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak bu çalışma ile, Türkiye’de tüm levrek kuluçkahaneleri ve yetiştirme işletmelerindeki betanodavirus yaygınlığı tüm yaş gruplarını kapsayacak şekilde araştırılmış ve sadece fingerling boy balıklarda virus tespit edilmiştir. Virusun izole edildiği kuluçkahane ve işletmede mortalitelerin olmaması, levreklerin sağlıklı görünümde olmaları ve tespit edilen viral yükün düşük olması enfeksiyonun subklinik olduğunu, biyogüvenliğin uygulandığı diğer yaş gruplarında virusun tespit edilmemesi aktif bir enfeksiyon olmadığını göstermektedir. Bu bilgiler ışığında kuluçkahanelerde betanodavirus sirkülasyonunun olmadığı, tespit edilen virusun ise deniz suyu kaynaklı olabileceği değerlendirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Betanodavirus, Kuluçkahane, Levrek, Prevalans, Türkiye.

SUMMARY

Investigation, Epidemiology and Molecular Characterisation of Viral Nervous Necrosis (VNN) Virus in European Sea Bass Hatcheries and Farms in Turkey

This study was carried out with the aim of investigating Viral Nervous Necrosis caused by Betanodavirus which is an important viral disease in all sea bass hatcheries and some aquaculture farms in Turkey. In this study, Real Time RT-PCR method proposed by OIE was quantitatively optimized, validation studies on analytical sensitivity, linear detection range, minimum detection limit, specificity, repeatability and reproducibility were performed and VNN diagnosis was introduced to the National Laboratory of Fish Diseases as an accredited method.

The prevalence of betanodavirus in Turkey has been investigated in all operational sea bass hatcheries (n:16) in all productive stages including actively fertilized eggs, pre-larvae (0-5 days), post-larvae (5-40 days), fry (40-80 days) and fingerling (80-120 days) and in some sea bass farms (n: 20) by epidemiological based sampling. In this concept, a total of 2460 samples were divided into 135 work groups with each group consisting of 10-30 fish. Work groups consisted of 15 groups of fertilized eggs from 8 hatcheries, 14 groups of pre-larvae (0-5 days old) from 9 hatcheries, 22 groups of post-larvae (5-40 days old) from 13 hatcheries, 43 groups of fry (40-80 days old) from 13 hatcheries and 41 groups of fingerlings (80-120 days old) from 9 hatcheries and 720 sea bass farm samples were used.

Betanodavirus RNA was detected in fingerlings in a hatchery and in small fish in a sea bass farm with a low viral load of $4,82 \times 10^2$, $3,10 \times 10^2$ copy/ μ l, respectively. The prevalence of betanodavirus in Turkish hatcheries and sea bass farms were calculated to be 6.25% (1/16) and % 5, respectively. The virus was propagated in SSN-1 cell line and produced CPE characterized by vacuolization and lysis. In the epidemiological study performed in the hatcheries where the virus was detected and the hatcheries known to be related, the virus could not be detected again. It was found out that the sea bass farm was a continuation of the hatchery where the virus was detected and they were in the same location. The virus was detected in fingerlings in the adaptation section where sea water was used directly, without biosecurity measures. Partial genome analysis of both RNA1 and RNA2 segments of the virus revealed that it was the Red spotted grouper nervous necrosis virus genotype which is endemic in the Mediterranean basin. Whole genome studies and phylogenetic analysis of the positive samples were performed according to both RNA1 and RNA2 segments. Whole sequences of RNA1 ORF (Protein A) of the detected viruses showed similarity with Italy isolates, followed by Taiwan and Singapore isolates; whole sequences of RNA2 ORF (capsid protein) were found to be similar to those of China, followed by Japan, Spain and Israel.

As a result of this study, the prevalence of betanodavirus of all production stages of all hatcheries and some sea bass farms in Turkey including all age groups of sea bass have been investigated and it was only detected in fingerling-size fish. The absence of mortality in the hatchery and the farm where the virus was detected, the healthy appearance of the sea bass and the low viral load indicate that the infection might be subclinical. Also, the fact that the

virus was not found in other age groups where biosecurity measures were implemented, shows that is not active infection. In the light of these findings, it can be concluded that there are no circulating betanodavirus in hatcheries and the detected virus could be of sea-water origin.

Key words: Betanodavirus, Hatchery, Sea bass, Prevalance, Turkey.



KAYNAKLAR

- AHLQUIST P, NOUEIRY AO, LEE WM, KUSHNER DB and DYE BT (2003). Host Factors in Positive-Strand RNA Virus Genome Replication. *Journal of virology* **77** (15): 8181–86.
- ALPBAZ A (2005). Su Ürünleri Yetiştiriciliği, Alp Yayınları, Özden Ofset. S:197-224.
- ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ (1990). Basic local alignment 3 search tool. *J Mol Biol.* **215**: 403-410
- ANONİM (2013). TÜRKİYE İSTATİSTİK YILLIĞI Turkey's Statistical Yearbook 2013, Türkiye İstatistik Kurumu, Yayın No: 4115, S:18.
- ANONİM (2014). OIE. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2014. Section 2.3. Diseases of Fish. Chapter 2.3.11 Viral encephalopathy and retinopathy http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.3.11_VNN.pdf. Erişim: 09.05.2015. 23:55
- ANONİM (2015). OIE. Aquatic Animal Health Code. Section 1. Chapter 1.4. Aquatic Animal Health Surveillance http://www.oie.int/index.php?id=171&L=0&htmfile=chapitre_aqua_animal_surveillance.htm. Erişim: 15.06.2015, 14:00
- ANONİM (2016). <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>. Erişim: 30.01.2016, 12:30
- ANONİM (2017a). OIE. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Section 2.3. Diseases of Fish. Chapter 2.3.12 Viral encephalopathy and retinopathy http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_viral_encephalopathy_retinopathy.pdf. Erişim: 10.06.2018. 23:55
- ANONİM (2017b). International Committee on Taxonomy of Viruses. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> Erişim: 11.06.2018. 23:43
- ANONİM (2017c). Important Parameters of Quantitative PCR (qPCR) Analysis (2017) https://tools.thermofisher.com/content/sfs/appendix/PCR_RTqPCR/Important%20Parameters%20of%20qPCR.pdf Erişim: 10.06.2017
- ANONİM (2018a). T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı - Balıkçılık Ve Su Ürünleri Genel Müdürlüğü; <http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BSGM.pdf>, Erişim: 08.06.2018 02:40
- ANONİM (2018b) FAO. 2018. Fishery and Aquaculture Statistics. Global aquaculture production 1950-2016 (FishstatJ). In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 2018. www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en
- ANONİM (2018c) https://www.pharmaq.no/sfiles/2/54/9/file/product-info_alpha-jet_micro-1-noda_english_2018-9.pdf Erişim: 17.06.2018, 14:40.
- ANONİM (2018d) <https://thefishsite.com/articles/new-sea-bass-vaccine-approved> Erişim: 17.06.2018, 14:50
- ANONİM (2018e) https://viralzone.expasy.org/614?outline=all_by_species Erişim: 17.04.2018, 14:30
- ANONİM (2019) <https://www.mgm.gov.tr/FILES/resmi-istatistikler/denizSuyu/Akdeniz-DenizSuyu-Sicakligi-Analizi.pdf> Erişim: 10.04.2019, 00:25.

- ARIMOTO M, MUSHIAKE K, MIZUTA Y, NAKAI T, MUROGA K and FURUSAWA I (1992). Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Gyobyo Kenkyu*, **27** (4): 191–195.
- ARIMOTO M, MARUYAMA K, FURUSAWA I (1993a). Epizootiology of viral nervous necrosis (VNN) in Striped Jack. *Fish. Pathol.* **29** (1): 19-24.
- ARIMOTO M, MORI K, NAKAI T, MUROGA K, FURUSAWA I (1993b). Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider). *Journal of Fish Diseases* **16** (5): 461–69.
- ARIMOTO M, SATO J, MARUYAMA K, MIMURA G, FURUSAWA I (1996). Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus. *Aquaculture* **143** (1): 15–22.
- ATHANASSOPOULOU F, BILLINIS C, PSYCHAS V, KARIPOGLOU K (2003). Viral encephalopathy and retinopathy of *Dicentrarchus labrax* (L.) farmed in fresh water in Greece. *J Fish Dis* **26**: 361–365
- ATHANASSOPOULOU F, BILLINIS C, PRAPAS T (2004). Important disease conditions of newly cultured species in intensive freshwater farms in Greece: First incidence of nodavirus infection in *Acipenser* sp. *Diseases of Aquatic Organisms* **60** (3): 247–52.
- BALL LA and JOHNSON KL (1999). Reverse genetics of nodaviruses. *Advances in Virus Research*, **53**: 229-244.
- BARKER DE, MACKINNON AM, BOSTON L, BURT MDB, CONE DK, SPEARE DJ, GRIFFITHS S, COOK M, RITCHIE R, OLIVIER G (2002). First report of piscine nodavirus infecting wild winter flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New Brunswick, Canada. *Dis. Aquat. Org.* **49**: 99–105.
- BAUD M, CABON J, SALOMONI A, TOFFAN A, PANZARIN V, BIGARRÉA L (2015) First generic one step real-time Taqman RT-PCR targeting the RNA1 of betanodaviruses. *Journal of Virological Methods* **211**: 1–7
- BELLANCE R, SAINT-AURIN DG (1988). L'encephalite virale loup mer. *Caraibes Med.* **2**: 105-144.
- BERZAK R, SCHEININ A, DAVIDOVICH N, REGEV Y, DIGA R, TCHERNOV D, MORICK D (2019). Prevalence of nervous necrosis virus (NNV) and *Streptococcus* species in wild marine fish and crustaceans from the Levantine Basin, Mediterranean Sea. *Dis Aquat Org* **133**: 7-17
- BIGARRÉ L, CABON J, BAUD M, HEIMANN M, BODY A, LIEFFRIG F, CASTRIC J (2009). Outbreak of betanodavirus infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in fresh water. *Journal of Fish Diseases* **32** (8): 667–73.
- BITCHAVA K, XYLOURI E, FRAGKIADAKI E, ATHANASSOPOULOU F, PAPANASTASSOPOULOU M AND SABATAKOU O (2007). First incidence of clinical signs of nodavirus infection in sea bream, *Sparus auratus* L. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh* **59**(1): 3-9.
- BLOCH B, GRAVNINGEN K, LARSEN JL (1991). Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Diseases of Aquatic Organisms* **10** (1): 65–70.
- BORGHESAN F, SELLI L, MANFRIN A, MUTNELLI F, QUALTIERI K, ORMELLI S, BOVO G, (2003). Winter outbreak of viral encephalopathy–retinopathy in farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Boll. Soc. It. Patol. Ittica* **36**: 15–23.

- BOVO G, GUSTINELLI A, QUAGLIO F, GOBBO F, PANZARIN V, FUSARO A, MUTINELLI F, CAFFARA M, FIORAVANTI ML (2011). Viral encephalopathy and retinopathy outbreak in freshwater fish farmed in Italy. *Dis. Aquat. Org.* **96**: 45–54.
- BROEDERS S, HUBER I, GROHMANN L, BERBEN G, TAVERNIERS I, MAZZARA M, ROOSENS N AND MORISSET D (2014). Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods, *Trends in Food Science & Technology*, **37**: 115-126.
- BREUIL G, BONAMI JR, PEPIN JF, PICHOT Y (1991). Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture* **97 (2–3)**: 109–16.
- BREUIL G, PEPIN JF, BOSCHER S, THIERY R (2002). Experimental vertical transmission of nodavirus from broodfish to eggs and larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases* **25 (12)**: 697–702.
- CAI D, QIU Y, QI N, YAN R, LIN M, NIE D, ZHANG J, HU Y (2010). Characterization of Wuhan Nodavirus subgenomic RNA3 and the RNAi inhibition property of its encoded protein B2. *Virus Research* **151 (2)**: 153–61.
- CANNON RM (2001). Sense and sensitivity - designing surveys based on an imperfect test. *Preventive Veterinary Medicine* **49**: 141-63.
- CARBALLO C, GARCIA-ROSADO E, BORREGO JJ and ALONSO MC (2016). SJNNV down-regulates RGNNV replication in European sea bass by the induction of the type I interferon system. *Vet. Res.* **47**: 6.
- CASTRIC J, THIÉRY R, JEFFROY J, KINKELIN PD, RAYMOND JC (2001). Sea bream *Sparus aurata*, an asymptomatic contagious fish host for nodavirus. *Diseases of Aquatic Organisms* **47 (1)**: 33–38.
- CHANG CW, SU YC, HER GM, KEN CF, HONG JR (2011). Betanodavirus Induces Oxidative Stress-Mediated Cell Death That Prevented by Anti-Oxidants and Zfcatalase in Fish Cells *PLOS ONE* **6 (10)**: e25853.
- CHANG JS AND CHI SC (2015). Grouper heat-shock cognate protein 70 (GHSC70) is Involved in the Cellular Entry of Nervous Necrosis Virus (NNV). *Journal of Virology* **89 (1)**: 61–70.
- CHAVES-POZO E, GUARDIOLA FA, MESEGUER J, ESTEBAN MA, CUESTA A (2012). Nodavirus infection induces a great innate cell-mediated cytotoxic activity in resistant, gilthead seabream, and susceptible, European sea bass, teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology* **33 (5)**: 1159–66.
- CHEN-FEI L, HAMIDUN B (2016). Data set of phylogenetic analysis inferred based on the complete genomes of the family Nodaviridae. *Data in Brief* **8**: 1454–1461.
- CHEN SP, YANG HL, MOUR G, LIN HY, JENG MF, WU JL, HONG JR (2006). Betanodavirus induces phosphatidylserine exposure and loss of mitochondrial membrane potential in secondary necrotic cells, both of which are blocked by bongkreikic acid. *Virology* **347 (2)**: 379–91.
- CHEN SP, WU JL, SU YC, HONG JR (2007). Anti-Bcl-2 family members, zfBcl-xL and zfMcl-1a, prevent cytochrome c release from cells undergoing betanodavirus-induced secondary necrotic cell death. *Apoptosis* **12 (6)**: 1043–60.
- CHEN YM, SU YL, SHIE PS, Huang SL (2008). Grouper Mx confers resistance to nodavirus and interacts with coat protein. *Developmental & Comparative Immunology* **32 (7)**: 825–36.

- CHEN LJ, SU YC, HONG JR (2009). Betanodavirus non-structural protein B1: A novel anti-necrotic death factor that modulates cell death in early replication cycle in fish cells. *Virology* **385** (2): 444–54.
- CHEN YM, SHIH CH, LIU HC, WU CL, LIN CC, WANG HC, CHEN TY, YANG HL, LIN JHY (2011). An oral nervous necrosis virus vaccine using *Vibrio anguillarum* as an expression host provides early protection. *Aquaculture*, **321** (1-2): 26-33.
- CHEN YM, WANG TY, CHEN TY (2014). Immunity to betanodavirus infections of marine fish. *Developmental and Comparative Immunology* **43** (2): 174–83.
- CHEN CW, WU MS, HUANG YJ, CHENG CA, CHANG CY (2015a). Recognition of linear B-cell epitope of Betanodavirus coat protein by RG-M18 neutralizing mAb inhibits Giant Grouper Nervous Necrosis Virus (GGNNV) Infection. *PloS One* **10** (5): e0126121.
- CHEN HY, LIU W, WU SY, CHIOU PP, LI YH, CHEN C, LIN GH, LU MW, WU JL (2015b). RIG-I specifically mediates group II type I IFN activation in nervous necrosis virus infected zebrafish cells. *Fish and Shellfish Immunology* **43** (2): 427-435.
- CHEN NC, YOSHIMURA M, GUAN HH, WANG TY, MISUMI Y, LIN CC, CHUANKHAYAN P, NAKAGAWA A, CHAN SI, TSUKIHARA T, CHEN TY, CHEN CJ (2015c). Crystal Structures of a Piscine Betanodavirus: Mechanisms of Capsid Assembly and Viral Infection. *PLoS Pathogens* **11** (10): 1–25.
- CHEN SP, PENG RH, CHIOU PP (2015d). Modulatory effect of CpG oligodeoxynucleotide on a DNA vaccine against nervous necrosis virus in orange spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish & Shellfish Immunol.* **45** (2): 919-926.
- CHÉRIF N, THIÉRY R, CASTRIC J, BIACCHESI S, BRÉMONT M, THABTI F, LIMEM L, HAMMAMI S (2009). Viral encephalopathy and retinopathy of *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in Tunisia. *Vet. Res. Commun* **33**: 345–353.
- CHÉRIF N, GAGNÉ N, GROMAN D, KIBENGE F, IWAMOTO T, YASON C, HAMMAMI S (2010). Complete sequencing of Tunisian redspotted grouper nervous necrosis virus betanodavirus capsid gene and RNA-dependent RNA polymerase gene. *Journal of Fish Diseases* **33** (3): 231–40.
- CHI SC, HU WW and LO BL (1999). Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV). *J. Fish Dis.*, **22**: 173–182.
- CHI SC, LO BJ and LIN SC (2001). Characterization of grouper nervous necrosis virus. *J. Fish Dis.* **24** (1): 3–13.
- CHI SC, SHIEH JR, LIN SJ (2003). Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.* **55**: 221–228.
- CHI SC, WU YC, CHENG TM (2005). Persistent infection of betanodavirus in a novel cell line derived from the brain tissue of barramundi *Lates calcarifer*. *Dis. Aquat. Org.* **65**: 91–98.
- COEURDACIER JL, LAPORTE F, PEPIN JF (1999). Preliminary study of immunogenicity and protection against nodavirus following injection of synthetic peptides from its capsid protein, in: IX th International Conference "Fish and Shellfish Diseases". Rhodes, Grece: European Association of Fish Pathologists.

- COEURDACIER JL, LAPORTE F, PEPIN JF (2003). Preliminary approach to find synthetic peptides from nodavirus capsid potentially protective against sea bass viral encephalopathy and retinopathy. *Fish. Shellfish Immunol.* **14**: 435-447.
- COMPS M, PEPIN JF, BONAMI JR (1994). Purification and characterization of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, **123** (1-2): 1-10.
- COMPS M, RAYMOND JC (1996). Virus-like particles in the retina of the sea bream, *Sparus aurata*. *Bulletin Of The European Association Of Fish Pathologists* **16** (5): 161-63.
- COSTA JZ, ADAMS A, BRON JE, THOMPSON KD, STARKEY WG, RICHARDS RH (2007). Identification of B-cell epitopes on the betanodavirus capsid protein. *J. Fish. Dis.* **30**: 419-429.
- COSTA JZ, THOMPSON KD (2016). Understanding the interaction between Betanodavirus and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy. *Fish and Shellfish Immunology* **53**: 35-49.
- CURTIS PA, DRAWBRIDGE M, IWAMOTO T, NAKAI T, HEDRICK RP, GENDRON AP (2001). Nodavirus infection of juvenile white seabass, *Atractoscion nobilis*, cultured in southern California: First record of viral nervous necrosis (VNN) in North America. *Journal of Fish Diseases* **24** (5): 263-71.
- CUTRIN JM, DOPAZO CP, THIÉRY R, LEO P, OLVEIRA JG, BARJA JL, BANDIN I (2007). Emergence of pathogenic betanodaviruses belonging to the SJNNV genogroup in farmed fish species from the Iberian Peninsula. *Journal of Fish Diseases* **30** (4): 225-32.
- DALLA VALLE L, ZANELLA L, PATARNELLO P, PAOLUCCI L, BELVEDERE P, COLOMBO L (2000). Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *J. Fish Dis.* **23** (5): 321-327.
- DALLA VALLE L, TOFFOLO V, LAMPRECHT M, MALTESE C, BOVO G, BELVEDERE P, COLOMBO L (2005). Development of a sensitive and quantitative diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on two-target real-time PCR. *Vet. Microbiol.* **110**: 167-179.
- DAVID R, TRÉGUIER C, MONTAGNANI C, BELLARD C, LEVY P, NÉDÉLEC G, JOUFOQUES V, REMOISSENET G, GUEGUEN Y AND COCHENNEC-LAUREAU N (2010). Molecular detection of betanodavirus from the farmed fish, *Platax orbicularis* (Forsskal) (Ephippidae), in French Polynesia. *Journal of Fish Diseases* **33** (5): 451-54.
- DELSERT C, MORIN N, COMPS M (1997). A fish encephalitis virus that differs from other nodavirus by its capsid protein processing. *Arch. Virol.* **142** (12): 2359-71.
- DIOS S, POISA-BEIRO L, FIGUERAS A, NOVOA B (2007). Suppression subtraction hybridization (SSH) and macroarray techniques reveal differential gene expression profiles in brain of sea bream infected with nodavirus. *Molecular Immunology* **44** (9): 2195-2204.
- FENNER BJ, GOH W and KWANG J (2006a). Sequestration and Protection of Double-Stranded RNA by the Betanodavirus B2 Protein. *Journal of Virology* **80** (14): 6822-33.

- FENNER BJ, THIAGARAJAN R, CHUA HK and KWANG J (2006b). Betanodavirus B2 Is an RNA Interference Antagonist That Facilitates Intracellular Viral RNA Accumulation. *Journal of Virology* **80** (1): 85–94.
- FENNER BJ, GOH W and KWANG J (2007). Dissection of double-stranded RNA binding protein B2 from betanodavirus. *Journal of Virology* **81** (11): 5449–59.
- FIELDS (2013). Virology 6th Edition Edited by David M. Knipe and Peter M. Howley. Philadelphia, PA, USA. Lippincott Williams & Wilkins, 2456 pp.
- FINLAY BB, MCFADDEN G (2006). Review Anti-Immunology: Evasion of the Host Immune System by Bacterial and Viral Pathogens. *Cell* **124** (4): 767–82.
- FISHER AJ, JOHNSON JE (1993). Ordered duplex RNA controls capsid architecture in an icosahedral animal virus. *Nature* **361**: 176–179.
- FRERICHS GN, RODGER HD, PERIC Z (1996). Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J. Gen. Virol.* **77**: 2067–2071.
- FRERICHS GN, TWEEDIE A, STARKEY WG, RICHARDS RH (2000). Temperature, pH, and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. *Aquaculture* **185** (1-2) 13–24.
- FUKUDA Y, NGUYEN HD, FURUHASHI M and NAKAI T (1996). Mass Mortality of Cultured Sevenband Grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, Associated with Viral Nervous Necrosis. *Fish Pathology* **31** (3): 165–70.
- FURUSAWA R, OKINAKA Y, UEMATSU K, NAKAI T (2007). Screening of freshwater fish species for their susceptibility to a betanodavirus. *Dis. Aquat. Org.* **77**: 119–125.
- GALLAGHER TM and RUECKERT RR (1988). Assembly-dependent maturation cleavage in provirions of a small icosahedral insect ribovirus. *J. Virol.* **62**: 3399–3406.
- GLAZEBROOK JS, HEASMAN MP, BEER SW (1990). Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Journal of Fish Diseases* **13** (3): 245–49.
- GOMEZ DK, SATO J, MUSHIAKE K, ISSHIKI T, OKINAKA Y, NAKAI T (2004). PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *J. Fish Dis.* **27** (10): 603–608.
- GOMEZ DK, LIM DJ, BAECK GW, YOUN HJ, SHIN NS, YOUN HY, HWANG CY, PARK JH and PARK SC (2006). Detection of betanodaviruses in apparently healthy aquarium fishes and invertebrates. *J. Vet. Sci.* **7** (4): 369–374.
- GOMEZ DK, BAECK GW, KIM JH, CHORESCA CH, PARK SC (2008a). Genetic analysis of betanodaviruses in subclinically infected aquarium fish and invertebrates. *Current Microbiology* **56** (5): 499–504.
- GOMEZ DK, BAECK GW, KIM JH, CHORESCA CH, PARK SC (2008b). Molecular detection of betanodaviruses from apparently healthy wild marine invertebrates. *Journal of Invertebrate Pathology* **97** (3): 197–202.
- GOMEZ DK, MORI K, OKINAKA Y, NAKAI T, PARK SC (2010). Trash fish can be a source of betanodaviruses for cultured marine fish. *Aquaculture* **302** (3–4): 158–63.
- GROTMOL S, TOTLAND GK, THORUD K, HJELTNES BK (1997). Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: A probable cause of mass mortality of cultured larval and juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Disease of Aquatic Organisms* **29** (2): 85–97.

- GROTMOL S, NERLAND AH, BIERING E, TOTLAND GK, NISHIZAWA T (2000). Characterisation of the capsid protein gene from a nodavirus strain affecting the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and design of an optimal reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection assay. *Diseases of Aquatic Organisms* **39** (2): 79–88.
- GROTMOL S, TOTLAND GK (2000). Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Dis. Aquat. Org.* **39**: 89–96.
- GROVE S, FALLER R, SOLEIM KB & DANNEVIG BH (2006). Absolute quantitation of RNA by a competitive real-time RT-PCR method using piscine nodavirus as a model. *J. Virol. Methods*, **132**: 104–112.
- GUO YX, DALLMANN K, KWANG J (2003a). Identification of nucleolus localization signal of betanodavirus GGNNV protein α . *Virology* **306** (2): 225–35.
- GUO YX, WEI T, DALLMANN K, KWANG J (2003b). Induction of caspase-dependent apoptosis by betanodaviruses GGNNV and demonstration of protein α as an apoptosis inducer. *Virology* **308** (1): 74–82.
- HATA N, OKINAKA Y, IWAMOTO T, KAWATO Y, MORI K, NAKAI T (2010). Identification of RNA regions that determine temperature sensitivities in betanodaviruses. *Archives of Virology* **155** (10): 1597–1606.
- HATA N, OKINAKA Y, SAKAMOTO T, IWAMOTO T, NAKAI T (2007) Upper temperature limits for the multiplication of betanodaviruses. *Fish Pathol*, **42**: 225–228.
- HE M, TENG CB (2015). Divergence and codon usage bias of Betanodavirus, a neurotropic pathogen in fish. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **83**: 137–42.
- HEGDE A, TEH HC, LAM TJ, SIN YM (2003). Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poecilia reticulata* - Comparative characterization and pathogenicity studies. *Archives of Virology* **148** (3): 575–86.
- HICK P, WHITTINGTON RJ (2010). Optimisation and validation of a real-time reversetranscriptase-polymerase chain reaction assay for detection of betanodavirus. *J. Virol. Methods* **163**: 368–377.
- HODNELAND K, GARCIA R, BALBUENA JA, ZARZA C, FOUZ B (2011). Real-time RT-PCR detection of betanodavirus in naturally and experimentally infected fish from Spain. *J. Fish Dis.* **34**: 189–202.
- HUANG B, TAN C, CHANG SF, MUNDAY B, MATHEW JA, NGOH GH, KWANG J (2001). Detection of nodavirus in barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), using recombinant coat protein-based ELISA and RT-PCR. *J. Fish Dis.* **24**: 135–142.
- HUANG YC, HAN YS (2014). Determining anti-betanodavirus compounds through a GF-1 cell-based screening platform. *Antivir. Res.* **105**: 47–53.
- HUANG YC, LIN TS, PENG C, CHAN NL, HAN YS (2015). Strong inhibition of betanodavirus replication by ribavirin targeting RNA-dependent RNA polymerase. *J. Fish. Dis.* **39** (5): 619–623.
- HÚSGARÐ S, BIERING E, GROTMOL S, HJETNES BK (1999). Experimental challenge of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) with a nodavirus, in: IXth International Conference “Fish and Shellfish Diseases”. Rhodes, Greece: European Association of Fish Pathologists.

- ICHINOSE T, MUSYOKA TM, WATANABE K, KOBAYASHI N (2013). Evaluation of antiviral activity of Oligonol, an extract of Litchi chinensis, against betanodavirus. *Drug Discov. Ther.* **7** (6): 254-260
- ITO Y, OKINAKA Y, KOH MORI K, SUGAYA T, NISHIOKA T, OKA M, NAKAI T (2008). Variable region of betanodavirus RNA2 is sufficient to determine host specificity. *Diseases of Aquatic Organisms* **79** (3): 199–205.
- IWAMOTO T, MORI K, ARIMOTO M, NAKAI T (1999). High permissivity of the fish cell line SSN-1 for piscine nodavirus. *Dis. Aquat. Organ.* **39**: 37-47.
- IWAMOTO T, NAKAI T, MORI K, ARIMOTO M, FURUSAWA I (2000). Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Org.*, **43**: 81–89.
- IWAMOTO T, OKINAKA Y, MISE K, MORI K, ARIMOTO M, OKUNO T and NAKAI T (2004). Identification of host-specificity determinants in betanodaviruses by using reassortants between striped jack nervous necrosis virus and sevenband grouper nervous necrosis virus. *Journal of virology* **78** (3): 1256–62.
- IWAMOTO T, MISE K, TAKEDA A, OKINAKA Y, MORI K, ARIMOTO M, OKUNO T, NAKAI T (2005). Characterization of striped jack nervous necrosis virus subgenomic RNA3 and biological activities of its encoded protein B2. *Journal of General Virology* **86**: 2807–16.
- JIA P, JIN Y, CHEN L, ZHANG J, JIA K (2016). Molecular characterization and expression analysis of mitochondrial antiviral signaling protein gene in sea perch, *Lateolabrax japonicus*. *Developmental and Comparative Immunology* **55**: 188–93.
- JOHANSEN R, RANHEIM T, HANSEN MK, TAKSDAL T, TOTLAND GK (2002). Pathological changes in juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* persistently infected with nodavirus. *Dis. Aquat. Org.* **50**: 161–169.
- JOHANSEN R, AMUNDSEN M, DANNEVIG BH, SOMMER AI (2003). Acute and persistent experimental nodavirus infection in spotted wolffish *Anarhichas minor*. *Dis. Aquat. Org.* **57**: 35–41.
- JOHANSEN R, ROVE S, SVENDSEN NAK, MODAHL I, DANNEVIG B (2004). A sequential study of pathological findings in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L), throughout one year after an acute outbreak of viral encephalopathy and retinopathy. *J. Fish Dis.* **27** (6): 327–341.
- JOHNSON KL, PRICE BD AND BALL LA (2003). Recovery of Infectivity from cDNA Clones of Nodamura Virus and Identification of Small Nonstructural Proteins. *Virology* **305** (2): 436–51.
- KALAYCI G, ÖZKAN B, PEKMEZ K, KAPLAN M (2016). Levrek ve Çipura Kuluçkahanelerinde Viral Nervöz Nekrozis Hastalığının Durumu. XII. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, Kapadokya/Nevşehir, 30 Ağustos – 02 Eylül 2016 (Poster).
- KAI YH, CHI SC (2008). Efficacies of inactivated vaccines against betanodavirus in grouper larvae (*Epinephelus coioides*) by bath immunization. *Vaccine* **26** (11): 1450–57.
- KAI YH, SU HM, TAI KT, CHI SC (2010). Vaccination of grouper broodfish (*Epinephelus tukula*) reduces the risk of vertical transmission by nervous necrosis virus. *Vaccine* **28** (4): 996–1001.
- KORSNES K, DEVOLD M, NERLAND AH, NYLUND A (2005). Viral encephalopathy and retinopathy (VER) in Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal challenge

- with a nodavirus from Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Dis Aquat Org* **68**: 7–15
- KORSNES K, KARLSBAKK E, DEVOLD M, NERLAND AH, NYLUND A (2009). Tissue tropism of nervous necrosis virus (NNV) in Atlantic cod, *Gadus morhua* L., after intraperitoneal challenge with a virus isolate from diseased Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *J. Fish. Dis.* **32 (8)**: 655–665.
- KRONDIRIS JV AND SIDERIS DC (2002). Intramolecular disulfide bonding is essential for betanodavirus coat protein conformation. *Journal of General Virology* **83 (9)**: 2211–14.
- KUAN YC, SHEU F, LEE GC, TSAI MW, HUNG CL, NAN FH (2012). Administration of recombinant Reishi immunomodulatory protein (rLZ-8) diet enhances innate immune responses and elicits protection against nervous necrosis virus in grouper *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology* **32 (6)**: 986–93.
- KUO HP, CHUNG CL, HUNG YF, LAI YS, CHIOU PP, LU MW, KONG ZL (2016). Comparison of the responses of different recombinant fish type I interferons against betanodavirus infection in grouper. *Fish. Shellfish Immunol.* **49**: 143–153.
- LAI YX, JIN BL, XU Y, HUANG LJ, HUANG RQ (2014). Immune responses of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, against virus-like particles of betanodavirus produced in *Escherichia coli*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **157**: 87–96.
- LIU W, HSU CH, HONG YR, WU SC, WANG CH, WU YM, CHAO CB AND LIN CS (2005). Early endocytosis pathways in SSN-1 cells infected by dragon grouper nervous necrosis virus. *Journal of General Virology* **86**: 2553–61.
- LI WH, TANIMURA N and SHARP PM (1988). Rate and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evol.* **5**: 313–330.
- LIU W, HSU CH, CHANG CY, CHEN HH, LIN CS (2006). Immune response against grouper nervous necrosis virus by vaccination of virus-like particles. *Vaccine* **24 (37-39)**: 6282–87.
- LIU XD, HUANG JN, WENG SP, HU XQ, CHEN WJ, QIN ZD, DONG XX, LIU XL, ZHOU Y, ASIM M, WANG WM, HE JG, LIN L (2015). Infections of nervous necrosis virus in wild and cage-reared marine fish from South China Sea with unexpected wide host ranges. *Journal of Fish Diseases* **38 (6)**: 533–40.
- LIN CH, CHRISTOPHER JOHN JA, LIN CH, CHANG CY (2006). Inhibition of nervous necrosis virus propagation by fish Mx proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **351 (2)**: 534–39.
- LIN CC, LIN JHY, CHEN MS, YANG HL (2007). An oral nervous necrosis virus vaccine that induces protective immunity in larvae of grouper (*Epinephelus coioides*), *Aquaculture* **268**: 265–273.
- LOPEZ-JIMENA B, CHERIF N, GARCIA-ROSADO E, INFANTE C, CANO I, CASTRO D, HAMMAMI S, BORREGO JJ, AND ALONSO MC (2010). A combined RT-PCR and dot-blot hybridization method reveals the coexistence of SJNNV and RGNNV betanodavirus genotypes in wild meagre (*Argyrosomus regius*). *Journal of Applied Microbiology* **109 (4)**: 1361–69.
- LOPEZ-JIMENA B, ALONSO MC, THOMPSON KD, ADAMS A, INFANTE C, CASTRO D, BORREGO J J, ROSADO EG (2011). Tissue distribution of Red Spotted Grouper

- Nervous Necrosis Virus (RGNNV) genome in experimentally infected juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Vet. Microbiol.* **154** (1-2): 86-95.
- MALTESE C and BOVO G (2007). Viral encephalopathy and retinopathy. *Ittiopatologia*, **4**, 93-146.
- MAO MG, WEN SH, PERÁLVAREZ-MARIN A, LI H, JIANG JL, JIANG ZQ, LI X, SUN H, LU HQ (2015). Evidence for and characterization of nervous necrosis virus infection in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*). *Archives of Virology* **160** (9): 2237-2248.
- MÉZETH KB, PATEL S, HENRIKSEN H, SZILVAY AM, NERLAND AH (2009). B2 protein from betanodavirus is expressed in recently infected but not in chronically infected fish. *Diseases of Aquatic Organisms* **83**: 97-103.
- MLADINEO I (2003). The immunohistochemical study of nodavirus changes in larval, juvenile and adult sea bass tissue. *Journal of Applied Ichthyology* **19** (6): 366-70.
- MONTES A, FIGUERAS A, NOVOA B (2010). Nodavirus encephalopathy in turbot (*Scophthalmus maximus*): Inflammation, nitric oxide production and effect of anti-inflammatory compounds. *Fish and Shellfish Immunology* **28** (2): 281-88.
- MOODY NJG, HORWOOD PF, REYNOLDS A, MAHONY TJ, ANDERSON IG, OAKEY HJ (2009). Phylogenetic analysis of betanodavirus isolates from Australian finfish. *Diseases of Aquatic Organisms* **87** (3): 151-60.
- MORI K, NAKAI T, NAGAHARA M, MUROGA K, MEKUCHI T AND KANNO T (1991). A Viral Disease in Hatchery-reared Larvae and Juveniles of Redspotted Grouper. *Fish pathology* **26** (4): 209-10.
- MORI K, NAKAI T, MUROGA K, ARIMOTO M, MUSHIAKE K, FURUSAWA I (1992). Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology* **187** (1): 368-371.
- MORI K, MUSHIAKE K and ARIMOTO M (1998). Control measures for viral nervous necrosis in striped jack. *Fish Pathol.* **33** (4): 443-444.
- MORI K, MANGYOKU T, IWAMOTO T, ARIMOTO M, TANAKA S, NAKAI T (2003). Serological relationships among genotypic variants of betanodavirus. *Dis. Aquat. Org.* **57** (1-2) 19-26.
- MORI K, SUGAYA T, NISHIOCAT, GOMEZ DK, FUJINAMY Y, OKA M, ARIMOTO M, OKINAKA Y and NAKAI T (2005). Detection of Betanodaviruses from feed fish used in marine aquaculture. In: 12th International Conference *Diseases of Fish and Shellfish*, European Association of Fish Pathologists. Copenhagen (Denmark), 11-16 September 2005. Abstract O-142.
- MUNANG'ANDU HM and EVENSEN OA (2015). Review of intra- and extracellular antigen delivery systems for virus vaccines of finfish. *J. Immunol. Res.* 960859.
- MUNDAY BL, NAKAI T, NGUYEN HD (1994). Antigenic relationship of the picorna-like virus of larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch to the nodavirus of larval striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider). *Aust. Vet. J.* **71** (11): 384-85.
- MUNDAY BL, NAKAI T (1997). Nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **13** (4): 375-81.
- MUNDAY BL, KWANG J, MOODY N (2002). Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.* **25** (3): 127-142.

- MURPHY FA, FAUQUET CM, BISHOP DHL, GHABRIAL SA, JARVIS AW, MARTELLI GP, MAYO MA, SUMMERS MD (eds) (1995). Virus Taxonomy. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology Supplement* **10**: 590 pp.
- MUSHIAKE K, NISHIZAWA T, NAKAI T, FURUSAWA I and MUROGA K (1994). Control of VNN in striped jack: Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol.* **29** (3): 177–182.
- NAKAI T, MORI K, ARIMOTO M, MUROGA K (1995). Neutralizing antibody production in Striped Jack immunized with a recombinant coat protein of Striped Jack Nervous Necrosis Virus (SJNNV), in: 7th International Conference 'Diseases of Fish and Shellfish'. 10-15 September. Palma de Mallorca, Spain: European Association of Fish Pathologists, 1995, p. 179.
- NAGAI T and NISHIZAWA T (1999). Sequence of the non-structural protein gene encoded by RNA1 of striped jack nervous necrosis virus. *Journal of General Virology* **80** (11): 3019–22.
- NE' VAREZ L, COZIEN J VE THIE'RY R (2005). Analysis of the phylogentic comparison of the capsid protein genes of RNA polymerase of fish nodavirus. *Virologie* **9**: 115–166 (in French).
- NERLAND AH, SKAAR C, ERIKSEN TB, BLEIE H (2007) Detection of nodavirus in seawater from rearing facilities for Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* larvae. *Dis Aquat Org* **73**: 201–205
- NGUYEN HD, MEKUCHI T, IMURA K, NAKAI T, NISHIZAWA T and MUROGA K (1994). Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in hatchery-reared juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries science* **60** (5): 551–54.
- NGUYEN HD, NAKAI T, MUROGA K (1996). Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* **24** (2): 99–105.
- NISHIZAWA T, MORI K, NAKAI T, FURUSAWA I, MUROGA K (1994). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat. Org.* **18**: 103–107.
- NISHIZAWA T, KISE M, NAKAI T and MUROGA K (1995a). Neutralizing monoclonal antibodies to striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Fish pathology* **30** (2): 111–14.
- NISHIZAWA T, MORI K, FURUHASHI M, NAKAI T, FURUSAWA I and MUROGA K (1995b). Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *Journal of General Virology* **76** (7): 1563–69.
- NISHIZAWA T, MUROGA K, ARIMOTO M (1996). Failure of the polymerase chain reaction (PCR) method to detect jack nervous necrosis virus (SJNNV) in striped jack *Pseudocaranx dentex* selected as spawners. *J. Aquat. Anim. Health.* **8** (4): 332–334.
- NISHIZAWA T, FURUHASHI M, NAGAI T, NAKAI T and MUROGA K (1997). Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (4): 1633–1636.
- NISHIZAWA T, TAKANO R and MUROGA K (1999). Mapping a neutralizing epitope on the coat protein of striped jack nervous necrosis virus. *J. Gen. Virol.* **80**: 3023–3027.

- NISHIZAWA T, TAKAMI I, YOSHIMIZU M, OH MJ (2011). Required dose of fish nervous necrosis virus (NNV) for Poly(I: C) immunization of sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Aquaculture* **311** (1-4): 100-104.
- NISHIZAWA T, JUNG H, TAKAMI I and OH MJ (2012). Potentiality of a live vaccine with nervous necrosis virus (NNV) for sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* at a low rearing temperature. *Vaccine* **30** (6): 1056–63.
- NUÑEZ-ORTIZ N, PASCOLI F, PICCHIETTI S, BUONOCORE F, BERNINI C, TOSON M, SCAPIGLIATI G AND TOFFAN A (2016). A formalin-inactivated immunogen against viral encephalopathy and retinopathy (VER) disease in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Immunological and protection effects. *Veterinary Research* **47** (1): 1–11.
- OH MJ, TAKAMI I, NISHIZAWA T, KIM WS, KIM CS, KIM SR, PARK MA (2012). Field tests of Poly(I: C) immunization with nervous necrosis virus (NNV) in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg). *J. Fish. Dis.* **35** (3): 187-191.
- OKINAKA Y, NAKAI T (2008). Comparisons among the complete genomes of four betanodavirus genotypes, *Dis Aquat Org* 80: 113–121
- OLVEIRA JG, SOUTO S, DOPAZO CP, THIÉRY R, BARJA JL and BANDIN I (2009). Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. *J. Gen. Virol.* **90** (12): 2940–2951.
- ØVERGÅRD AC, NERLAND AH, FIKSDAL IU, PATEL S (2012). Atlantic halibut experimentally infected with nodavirus shows increased levels of T-cell marker and IFN c transcripts. *Developmental & Comparative Immunology* **37** (1): 139–50.
- ÖZKAN ÖZYER B, KALAYCI G, İNÇOĞLU Ş (2012). Ege Bölgesinde Levrek (*Dicentrarchus Labrax* L.) ve Çipura (*Sparus Aurata* L.) İşletmelerinde Viral Nervöz Nekrozis Hastalığının Varlığının Araştırılması. *Bornova Vet. Bil. Der.* **34** (48): 1-8.
- ÖZKAN ÖZYER B, KALAYCI G, İNÇOĞLU Ş, PEKMEZ K, KÜÇÜKALİ Y (2014). Türkiye’de Kültürü Yapılan Levreklerden Betanodavirus’un İlk İzolasyonu. *Bornova Vet. Bil. Der.* **36** (50): 13-17.
- PAKINGKING R, SERON R, PENA LD, MORI K, YAMASHITA H, NAKAI T (2009). Immune responses of Asian sea bass, *Lates calcarifer* Bloch, against an inactivated betanodavirus vaccine. *J. Fish. Dis.* **32** (5): 457-463.
- PAKINGKING R, BAUTISTA NB, JESUS-AYSON EGD, REYES O (2010). Protective immunity against viral nervous necrosis (VNN) in brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) following vaccination with inactivated betanodavirus. *Fish. Shellfish Immunol.* **28** (4): 525-533
- PANZARIN V, PATARNELLO P, MORI A, RAMPAZZO E, CAPPELLOZZA E, BOVO G, CATTOLI G (2010). Development and validation of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens. *Arch. Virol.* **155**: 1193–1203.
- PANZARIN V, FUSARO A, MONNE I, CAPPELLOZZA E, PATARNELLO P, BOVO G, CAPUA I, HOLMES EC, CATTOLI G (2012). Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. *Infect Genet Evol* **12** (1): 63–70.

- PANZARIN V, CAPPELLOZZA E, MANCIN M, MILANI A, TOFFAN A, TERREGINO C and CATTOLI G (2014). In vitro study of the replication capacity of the RGNNV and the SJNNV betanodavirus genotypes and their natural reassortants in response to temperature. *Veterinary Research* **45** (1): 1–11.
- PANZARIN V, TOFFAN A, ABBADI M, BURATIN A, MANCIN M, BRAAEN S, OLSEN CM, BARGELLONI L, RIMSTAD E, CATTOLI G (2016). Molecular basis for antigenic diversity of genus Betanodavirus. *PLoS ONE* **11** (7): 1–18.
- POISA-BEIRO L, DIOS S, MONTES A, ARANGUREN R, FIGUERAS A, NOVOA B (2008). Nodavirus increases the expression of Mx and inflammatory cytokines in fish brain. *Mol. Immunol.* **45** (1): 218-225.
- PRINGLE CR (1996). Virus Taxonomy 1996 - A Bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. *Arch Virol* **141** (11): 2251-2256.
- PRINGLE CR (1997). Virus taxonomy – 1997. Proceedings of the 26th Meeting of the Executive Committee of the ICTV, Strasbourg, France, May 10–11, 1997. *Arch Virol* **142**:1727–1733.
- RENAULT T, HAFFNER PH, LAURENCIN F, BREUIL G and BONAMI JR (1991). Mass mortalities in hatchery-reared sea bass (*Lateolabrax niloticus*) larvae associated with the presence in the brain and retina of virus-like particles. *Bulletin Of The European Association Of Fish Pathologists (EAFP)* **11** (2): 68–73.
- SAKAMOTO T, OKINAKA Y, MORI K, SUGAYA T, NISHIOKA T, OKA M, YAMASHITA H and NAKAI T (2008). Phylogenetic Analysis of Betanodavirus RNA2 Identified from Wild Marine Fish in Oceanic Regions. *Fish Pathology* **43** (1): 19–27.
- SALONEN A, AHOLA T, KAARIJAINEN L (2005). Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr Top Microbiol Immunol* **285**:139–173.
- SANO M, NAKAI T and FIJAN N (2011). Viral diseases and agents of warmwater fish. In: *Fish Diseases and Disorders*, Vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, 2nd edition, Woo P.T.K & Bruno D.W., eds. CABI, London, UK, 166–244.
- SCAPIGLIATI G, BUONOCORE F, RANDELLI E, CASANI D, MELONI S, ZARLETTI G, TIBERI M, DI PIETRETTI, BOSCHI I, MANCHADO M, MARTIN-ANTONIO B, JIMENEZ-CANTIZANO R, BOVO G, BORGHESAN F, LORENZEN N, EINER-JENSEN K, ADAMS S, THOMPSON K, ALONSO C, BEJAR J, CANO I, BORREGO JJ, ALVAREZ MC (2010). Cellular and molecular immune responses of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) experimentally infected with betanodavirus. *Fish and Shellfish Immunology* **28** (2): 303–11.
- SCHERER WF, HURLBUT HS (1967). Nodamura virus from Japan: a new and unusual arbovirus resistant to diethyl ether and chloroform. *American Journal of Epidemiology*, **86** (2): 271-85
- SCHNEEMANN A, REDDY V, JOHNSON JE (1998). The structure and function of nodavirus particles: a paradigm for understanding chemical biology. *Adv. Virus Res.*, **50**:381–446.
- SHETTY M, MAITI B, SHIVAKUMAR SANTHOSH K, VENUGOPAL MN, KARUNASAGAR I (2012). Betanodavirus of marine and freshwater fish: distribution, genomic organization, diagnosis and control measures. *Indian J Virol.* **23**(2):114–23

- SKLIRIS GP, RICHARDS RH (1998). Assessment of the susceptibility of the brine shrimp *Artemia salina* and rotifer *Brachionus plicatilis* to experimental nodavirus infections. *Aquaculture* **169** (1–2): 133–41.
- SKLIRIS GP, KRONDIRIS JV, SIDERIS DC, SHINN AP, STARKEY WG, RICHARDS RH (2001). Phylogenetic and antigenic characterization of new fish nodavirus isolates from Europe and Asia. *Virus Research* **75** (1): 59–67.
- SOMMERSET I, LORENZEN E, LORENZEN N, BLEIE H, NERLAND AH (2003). A DNA vaccine directed against a rainbow trout rhabdovirus induces early protection against a nodavirus challenge in turbot. *Vaccine* **21** (32): 4661–67.
- SOMMERSET I, NERLAND AH (2004). Complete sequence of RNA1 and subgenomic RNA3 of Atlantic halibut nodavirus (AHNV). *Diseases of Aquatic Organisms* **58** (2–3): 117–25.
- SOMMERSET I, SKERN R, BIERING E, BLEIE H, FIKSDALA IU, GROVED S, NERLAND AH (2005). Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. *Fish & Shellfish Immunology* **18** (1): 13–29.
- SOUTO S, OLVEIRA JG, BANDIN I (2015a). Influence of temperature on Betanodavirus infection in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Veterinary Microbiology* **179** (3–4): 162–67.
- SOUTO S, LOPEZ-JIMENA B, ALONSO MC, GARCIA-ROSADO E, BANDIN I (2015b). Experimental susceptibility of European sea bass and Senegalese sole to different betanodavirus isolates. *Veterinary Microbiology* **177** (1–2): 53–61.
- SOUTO S, MÉROUR E, BIACCHESSI S, BRÉMONT M, OLVEIRA JG and BANDIN I (2015c). In vitro and in vivo characterization of molecular determinants of virulence in reassortant betanodavirus. *Journal of General Virology* **96** (6): 1287–96.
- SOUTO S, OLVEIRA JG, DOPAZO CP and BANDIN I (2016). Reassortant betanodavirus infection in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Fish Diseases* **39** (11): 1347–56.
- STARKEY WG, IRELAND JH, MUIR KF, SHINN AP, RICHARDS RH, FERGUSON HW (2000). Isolation of nodavirus from Scottish farmed halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.) *J. Fish. Dis.* **23** (6): 418–422.
- STARKEY WG, IRELAND JH, MUIR KF, JENKINS ME, ROY WJ, RICHARDS RH, FERGUSON HW (2001). Nodavirus infection in Atlantic cod and Dover sole in the UK. *Vet. Rec.* **149**: 179–181.
- SU YC and HONG JR (2010). Betanodavirus B2 causes ATP depletion-induced cell death via mitochondrial targeting and complex II inhibition in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **285** (51): 39801–10.
- SU YC, WU JL, HONG JR (2011). Betanodavirus up-regulates chaperone GRP78 via ER stress : roles of GRP78 in viral replication and host mitochondria-mediated cell death. *Apoptosis* **16**: 272–87.
- SU YC, CHIU HW, HUNG JC, HONG JR (2014). Beta-nodavirus B2 protein induces hydrogen peroxide production, leading to Drp1-recruited mitochondrial fragmentation and cell death via mitochondrial targeting. *Apoptosis* **19** (10): 1457–70.
- SU Y, XU H, MA H, FENG J, WEN W, GUO Z (2015). Dynamic distribution and tissue tropism of nervous necrosis virus in juvenile pompano (*Trachinotus ovatus*) during early stages of infection. *Aquaculture* **440**: 25–31.

- TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, AND KUMAR S (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* **30**: 2725-2729.
- TAN C, HUANG B, CHANG SF, NGOH GH, MUNDAY B, CHEN SC, KWANG J (2001). Determination of the complete nucleotide sequences of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) nervous necrosis virus, Singapore strain. *J. Gen. Virol.* **82 (3)**: 647–653.
- TANAKA S, AOKI H and NAKAI T (1998). Pathogenicity of the nodavirus detected from diseased sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish. Pathol.* **33 (1)**: 31-36.
- TANAKA S, MORI K, ARIMOTO M, IWAMOTO T, NAKAI T (2001). Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *J. Fish. Dis.* **24 (1)**: 15-22.
- TANAKA S, TAKAGI M, VE MIYAZAKI T (2004). “Histopathological studies on viral nervous necrosis of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, at the grow-out stage”. *Journal of Fish Diseases* **27 (7)**: 385–99.
- TANG L, LIN CS, KRISHNA NK, YEAGER M, SCHNEEMANN A, JOHNSON JE (2002). Virus-like particles of a fish nodavirus display a capsid subunit domain organization different from that of insect nodaviruses. *J Virol.* **76**: 6370–6375.
- THIÉRY R, RAIMOND JC, CASTRIC J (1999). Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*: study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Virus Res.*, **63**: 11–17.
- THIÉRY R, COZIEN J, CABON J, LAMOUR F, BAUD M, SCHNEEMANN A (2006). Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* by using betanodavirus virus-like particles. *J. Virol.* **80 (20)**: 10201-10207.
- THIÉRY R, JOHNSON KL, NAKAI T, SCHNEEMANN A, BONAMI JR, LIGHTNER DV (2011). Family Nodaviridae. In: *Virus Taxonomy Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, KING AMQ, ADAMS MJ, CARSTENS EB AND LEFKOWITZ EJ, eds. Elsevier Academic Press, London, UK, 1061–1067.
- TOFFAN A, PASCOLI F, PRETTO T, PANZARIN V, ABBADI M, BURATIN A, QUARTESAN R, GIJÓN D and PADRÓS F (2017). “Viral nervous necrosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) caused by reassortant betanodavirus RGNNV/SJNNV: an emerging threat for Mediterranean aquaculture”. *Scientific Reports* 7 (January). Nature Publishing Group: 46755.
- TOFFOLO V, NEGRISOLO E, MALTESE C, BOVO G, BELVEDERE P, COLOMBO L, DALLA VALLE L (2007). Phylogeny of betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. *Mol. Phylogenet. Evol.* **43 (1)**: 298–308.
- VAN REGENMORTEL MHV, FAUQUET CM, BISHOP DHL, CARSTENS EB, ESTES MK, LEMON SM, MANILOFF J, MAYO MA, MCGEOCH DJ, PRINGLE CR AND WICKNER RB (2000). *Virus taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego. 1162 pp.
- VALERO Y, ARIZCUN M, CUESTA C, ESTEBAN MÁ, CHAVES-POZO E (2013). Histones h1 and h2b might have a role in the innate immune response of European seabass gonad upon infection with nodavirus, *Fish. Shellfish Immunol.* **34 (6)**: 1743.
- VALERO Y, GARCIA-ALCAZAR A, ESTEBAN MÁ, CUESTA A, ELENA CP (2015a). Antimicrobial response is increased in the testis of European sea bass, but not in

- gilthead seabream, upon nodavirus infection. *Fish & Shellfish Immunology* **44** (1): 203–213.
- VALERO Y, ARIZCUN M, M. ESTEBAN MÁ, BANDIN I, OLVEIRA JG, PATEL S, CUESTA A, ELENA CP (2015b). Nodavirus Colonizes and Replicates in the Testis of Gilthead Poze Seabream and European Sea Bass Modulating Its Immune and Reproductive Functions. *PLoS ONE* **10** (12): 1–24.
- VALERO Y, PATRICIA MORCILLO, FRANCESCO BUONOCORE, ESTEBAN MÁ, ELENA CP, CUESTA A. (2015c). Characterization of the IFN pathway in the teleost fish gonad against vertically transmitted viral nervous necrosis virus. *Journal of General Virology* **96** (8): 2176–2187.
- VAN REGENMORTELMNV, FAUQUET CM, BISHOP DHZ, CARSTENS EB, ESTES MK, LEMON SM, MANIOFF J, MAYO MA, MCGEOCH DJ, PRINGLE CR, WICKNER RB (Eds.), Virus Taxonomy Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, New York, 2000, pp. 747-755.
- VENDRAMIN N, PADRÓS F, PRETTO T, CAPPELLOZZA E, PANZARIN V, BOVO G, TOFFAN A AND TERREGINO C (2012). Viral encephalopathy and retinopathy outbreak in restocking facilities of the endangered freshwater species, *Salaria fluviatilis* (Asso). *Journal of Fish Diseases* **35** (11): 867–71.
- VENDRAMIN N, TOFFAN A, MANCIN M, CAPPELLOZZA E, PANZARIN V, BOVO G, CATTOLI G, CAPUA I VE TERREGINO C (2014). “Comparative pathogenicity study of ten different betanodavirus strains in experimentally infected European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.)”. *Journal of Fish Diseases* **37**: 371–83.
- VENDRAMIN N (2017). Update On Fish Disease Situation In The Mediterranean Basin 2016. Annual Workshop of the National Reference Laboratories. 30-31 May 2017. http://www.eurl-fish.eu/-/media/Sites/EURL-FISH/english/activities/annual%20meetings/21st-AW-2017/Presentations/Session-1/Niccol-Vendramin_Mediterranean.ashx?la=da Erişim: 10 Haziran 2018, 01:49.
- VENTOR PA, JOVEL J, SCHNEEMANN A (2010). Insect nodaviruses. In: Asgari S, Johnson KN, eds. *Insect Virology*. Norwich, UK: Caister Academic Press, 251–282.
- VIJAYKRISHNA D, MUKERJI R, SMITH GJD (2015). RNA Virus Reassortment: An Evolutionary Mechanism for Host Jumps and Immune Evasion. *PLoS Pathogens* **11** (7): 2–6.
- VIMAL S, MADAN N, FAROOK MA, NAMBI KSN, MAJEED SA, RAJKUMAR T, VENU S, THIRUNAVUKKARASU AR, SAHUL HAMEED AS (2014). Production of recombinant vaccine using capsid gene of nodavirus to protect Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). *Aquaculture* **418-419**: 148-154.
- WANG CH, HSU CH, WU YM, LUO YC, TU MH, CHANG WH, CHENG RH, LIN CS (2010). Roles of cysteines Cys115 and Cys201 in the assembly and thermostability of grouper betanodavirus particles. *Virus Genes* **41** (1): 73–80.
- WANG YD, RAJANBABU V, CHEN JY (2015). Transcriptome analysis of medaka following epinecidin-1 and TH1-5 treatment of NNV infection. *Fish. Shellfish Immunol.* **42** (1): 121-131.
- WATANABE K, NISHIZAWA T, YOSHIMIZU M (2000). Selection of broodstock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **41**, 219–223.

- WI GR, HWANG JY, KWON MG, KIM HJ, KANG HA, KIM HJ (2015). Protective immunity against nervous necrosis virus in convict grouper *Epinephelus septemfasciatus* following vaccination with virus-like particles produced in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Vet. Microbiol.* **177** (1-2): 214-218.
- WINTON JR (1998). Molecular approaches to fish vaccines. *Journal of Applied Ichthyology* **14** (3-4): 153-158.
- WU YC, CHI SC (2007). Cloning and analysis of antiviral activity of a barramundi (*Lates calcarifer*) Mx gene. *Fish. Shellfish Immunol.* **23** (1): 97-108.
- WU HC, CHIU CS, WU JL, GONG HY, CHEN MC, LU MW, HONG JR (2008a). Zebrafish anti-apoptotic protein zfBcl-x_L can block betanodavirus protein α -induced mitochondria-mediated secondary necrosis cell death. *Fish. Shellfish Immunol.* **24** (4): 436-49.
- WU YM, HSU CH, WANG CH, LIU W, CHANG WH, LIN CS (2008b). Role of the DxxDxD motif in the assembly and stability of betanodavirus particles. *Archives of Virology* **153** (9): 1633-42.
- WU YC, LU YF, CHI SC (2010a). Anti-viral mechanism of barramundi Mx against betanodavirus involves the inhibition of viral RNA synthesis through the interference of RdRp. *Fish and Shellfish Immunology* **28** (3): 467-75.
- WU HC, WU JL, CHU HL, SU YC, HONG JR (2010b) RGNNV induces mitochondria-mediated cell death via newly synthesized protein dependent pathway in fish cells. *Fish and Shellfish Immunology* **29** (3): 451-463.
- XYLOURI E, KOTZAMANIS YP, ATHANASSOPOULOU F, DONG L, PAPPAS IS, ARGYROKASTRITIS A AND FRAGKIADAKI E (2007). "Isolation, characterization, and sequencing of nodavirus in sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti* L.) reared in freshwater facilities". *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh* **59** (1): 36-41.
- YAMASHITA H, FUJITA Y, KAWAKAMI H and NAKAI T (2005). The efficacy of inactivated virus vaccine against Viral Nervous Necrosis (VNN) *Fish. Pathol.* **40** (1): 15-21.
- YAMASHITA H, MORI K, KURODA A, NAKAI T (2009a). Neutralizing antibody levels for protection against betanodavirus infection in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg), immunized with an inactivated virus vaccine. *Journal of Fish Diseases* **32** (9): 767-75.
- YAMASHITA H, MORI K, KURODA A, NAKAI T (2009b). Protection conferred against viral nervous necrosis by simultaneous inoculation of aquabirnavirus and inactivated betanodavirus in the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg). *Journal of Fish Diseases* **32** (2): 201-10.
- YOSHIKOSHI K, INOUE K (1990). Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel)". *Journal of Fish Diseases* **13** (1): 69-77.
- YUASA K, KOESHARYANI I, ROZA D, MORI K, KATATA M, NAKAI T (2002). Immune response of humpback grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes) injected with the recombinant coat protein of Betanodavirus. *J. Fish. Dis.* **25** (1): 53-56.
- YUASA K, KOESHARYANI I and MAHARDIKA K (2007). Effect of high water temperature on betanodavirus infection of fingerling humpback grouper *Cromileptes altivelis*. *Fish Pathol.*, **42** (4): 219-221.

EKLER

Ek-1. Etik Kurul İzin Yazısı

 T.C. GIDA TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü 		
BORNOVA VETERİNER KONTROL ENSTİTÜSÜ DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU PROJE DEĞERLENDİRME RAPORU		
Projenin Adı	Türkiye’de Levrek Kuluçkahaneleri ve İşletmelerinde Viral Nervöz Nekrozis (VNN) Virusunun Araştırılması, Epidemiyolojisi ve Moleküler Karakterizasyonu	
Proje Yürütücüsü	Dr. Murat KAPLAN	Viroloji Bölümü
Yardımcı Araştırmacılar	Prof. Dr. M.Taner KARAOĞLU	Doktora Tez Danışmanı
Projenin yürütüleceği yer/Bölüm	Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü	
Projenin süresi	24 ay	24 ay (01.01.2016-01.01.2018)
Kullanılacak Deneysel hayvan türü ve sayısı	Levrek	3120 adet
Yapılacak İşlemin kısa tanımı	Projede Türkiye’de bulunan tüm levrek kuluçkahaneleri ve bazı yetiştirme işletmelerinde bulunan levrek (<i>Dicentrarchus labrax</i>)’lerden Viral Nervöz Nekrozis (VNN) olarak bilinen Betanodavirus yaygınlığı araştırılacaktır. Levrek yetiştiriciliği yapılan işletmelerde bulunan farklı boylardaki/yaşlardaki balıklar örneklenecektir. VNN yaygınlığının saptanmasında Real-Time -Reverse -transcription polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR) tekniği kullanılacaktır. Proje sonunda hastalıktan korunmaya ve mücadeleye yönelik programlar belirlenecektir.	
GÖRÜŞLER		
Sunulan proje “ Hayvan deneyleri etik kurallarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik (6 Temmuz 2006 tarih ve 26220 sayılı Resmi Gazete) ve Enstitü Etik Kurul Yönergesine uygun bulunmuştur.		
KARAR (UYGUN / DÜZELTİLMESİ GEREKİR / KOŞULLU OLARAK UYGUN / UYGUN DEĞİLDİR) UYGUN		

22.12.2015

Dr. Nurdan ÇÖVEN
Veteriner Hekim

Dr. Gülçin ERDAL
Veteriner Hekim

Dr. Meriç Lütfi AVSEVER
Veteriner Hekim

Bülent KATFA
Uzman Veteriner Hekim

Z. Nurdan KAPLAN
Veteriner Hekim

H. Gökhan ÖZDEMİR
Sivil Üye

Serdar UNAL
Sivil Üye

Adres: Erzene Mah. Ankara Cad. No:172-155 Bornova 35040 İZMİR
Tel: +90 232 388 00 10 **Faks:** +90 232 388 50 52 **E-posta:** bornova@bornovavet.gov.tr **Web:** http://www.bornovavet.gov.tr/

Ek-2. Doktora Tez Konusunun Çalışılması Hakkında Bakanlık İzin Yazısı

REPUBLIQUE TURQUE DE TURQUIE
T.C. GIDA, TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI
Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü

11/12/2015

Sayı : 55016929-774-38707
Konu : Doktora Tez Konusu Belirlenmesi

İZMİR/BORNOVA VETERİNER KONTROL ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi : 08.12.2015 tarihli ve 10680 sayılı yazı.

İlgi yazısında talep edilen Veteriner Hekim Dr. Murat KAPLAN'ın doktora tez konuları incelenmiş olup, birinci sırada yer alan "Türkiye'de Levrak Kuluçkahaneleri ve İşletmelerinde Viral Nörotik Nekrozis (VNN) Virüsünün Araştırılması, Epidemiyolojisi ve Morfolojik Karakterizasyonu" tez konusunda çalışılacağı Genel Müdürlüğünüze uygun görülmüştür.

Gereğini rica ederim.

Dr. Süleyman ASLAN
Genel Müdür Yardımcısı

Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü
Talep ve İzin (2015) 286 77 24 Fide No : 120 014 71 24
E-Posta ve İletişim Bilgileri: İletişim Bilgileri: www.gkm.gov.tr

Dr. Ali DEMİREL
Veteriner Hekim

Ek-3. Tez Pozitif Örneklerinin Nükleotid Dizileri

TR.VNN.01.01-RNA1-Kısmi Nükleotid Dizisi

CCAACGCGTCATCGCTGAGAAGAAACAAATTCTCCGTGATGCGGGCCACGATCCGGACTC
AGATCCAGCGGGAAATGGAAGTGGTGCGCATTTCCGGTGCGCAAAGGCCATTCCCACCAG
GAAGCTGCTACTGAGCGTAACAGCGCCACTGAGACCATGCTCGGTGTGGTGGAGAAATG
CGGCTACGAGCCGTATGTCATTTCCGCCATCACCCCGTGAGGTTGGATACCACGGGTCACG
TCAGTTCTATAGTCTGGCAGACTTTCCGCAAGACTACCGTCGTGATGACATCACCGACCG
TCACATCATTGTGATGACTGATGTTGACTACTACGTGGACATGCATGAGTTGATTGGTTT
GGGTGTTCCGATATTGCTGTACACCTTCCAGCCAAGTACTGTGTCTGGGGAGGTCAAGGA
TGGTTATTTTACCATCACTGACGACTCCGTTCACTACCGTGTTGCTGGTGGGAAGGATGT
GCGCCATCGCATTTGGAAGTACAACCAGGATACCATGTATGTGTGCTCCCGACCTCGTG
TTTCTGGGCGAATCTGATGCAGATCTTCCGTGACATCACTGGTGTACCCGCGATCTGTAG
CTTTCTTTACCAAGCTCGGTATTGCGCCCTTCGGCGACCCTGTTACCATGTTACCGTT
GATCAATTCAAGATGGGCGAACATCGTAACATCGTGTCAATTGTGCCCTTTGCAACTTGC
CGTTCAAACCTGCTCAAGATCAGTGAGTATGGTGCTGAGTTGGAGTATATGCGCTACCAA
CAGCGCAACAACATTGCCAACTTCAACGCAGTCACCTACATCTCTGAGAATGGGCCACTC
ATCAGTCTGGGTTTGGAAAGGCAACTTTGCAAGCGTCCAGCTTCCCCTGCAGGATTTGAG
AACATCCGCACTGCATACGAACTGTCCAAAATAA

TR.VNN.01.02-RNA1-Kısmi Nükleotid Dizisi

CGGTCATCGCTGAGAAGAAACAAATTCTCCGTGATGCGGGCCACGATCCGGACTCAGATC
CAGCGGGAAATGGAAGTGGTGCGCATTTCCGGTGCGCAAAGGCCATTCCCACCAGGAAGC
TGCTACTGAGCGTAACAGCGCCACTGAGACCATGCTCGGTGTGGTGGAGAAATGCGGCT
ACGAGCCGTATGTCATTTCCGCCATCACCCCGTGAGGTTGGATACCACGGGTCACGTCAGT
TCTATAGTCTGGCAGACTTTCCGCAAGACTACCGTCGTGATGACATCACCGACCGCCACA
TCATTGTGATGACTGATGTTGACTACTACGTGGACATGCATGAGTTGATTGGTTTGGGTG
TTCCGATATTGCTGTACACCTTCCAGCCAAGTACTGTGTCTGGGGAGGTCAAGGATGGTT
ATTTTACCATCACTGACGACTCCGTTCACTACCGTGTTGCTGGTGGGAAGGATGTGCGCC
ATCGCATTTGGAAGTACAACCAGGATACCATGTATGTGTGCTCCCGACCTCGTGTTTCT
GGGCGAATCTGATGCAGATCTTCCGTGACATCACTGGTGTACCCGCGATCTGTAGCTTTT
TTTACATCAAGCTCGGTATTGCGCCCTTCGGCGACCCTGTTACCATGTTACCGTTGATCA
ATTCAAGATGGGCGAACATCGTAACATCGTGTCAATTGTGCCCTTTGCAACTTCCCGTTC
AAACCTGCTCAAGATCAGTGAGTATGGTGCTGAGTTGGAGTATATGCGCTACCAACAGC
GCAACAACATTGCCAACTTCAACGCAGTCACCTACATCTCTGAGAATGGGCCACTCATCA
GTCTGGGTTTGGAAAGGCAACTTTGCAAGCGTCCAGCTTCCCCTGCAGGATTTGAGAAC
TCCGCACTGCATACGAACTGTCCAAAATAA

TR.VNN.01.01-RNA2-Kısmi Nükleotid Dizisi

AAATTACGCCAATGTGCCCCGCAAACACGGGGCGGTGGTTACGTTGCTGGCTTCCTGCCTG
ATCCAAGTACAAACGACCACACCTTCGACGCGTTCAAGCAACTCGTGGTGCAGTCGTTG
CCAAATGGTGGGAAAGCAGAACAGTCCGACCCAGTACACCCGCACGCTCCTCTGGACC
TCGTGCGGAAAGGAGCAGCGTCTCACGTCACCTGGTCGGCTGATACTCCTGTGTGTTGGC
AACAACTGATGTGGTCAACGTGTGCTGTGTGCTGAGAGTGTTCGACTGAGCGTT
CCATCTCTTGAGACACCTGAAGAGACCACCGCTCCCATCATGACACAAGGTTCCCTGTAC
AACGATTCCCTTTCCACAAATGACTTCAAGTCCATCCTCCTAGGATCCACACCACTGGAC
ATTGCCCCTGATGGAGCAATCTTCCAGCTGGACCGTCCGCTGTCTATTGACTACAGCCTT
GGAAGTGGAGATGTTGACCGTGCTGTTTACTGGCACCTCAAGAAGTTTGCTGGAAATGCT
GGCACACCTGCAGGCTGGTTTCCGTGGGGC

TR.VNN.01.02-RNA2-Kısmi Nükleotid Dizisi

AATGTGCCCCGCAAACACGGGCGGTGGTTACGTTGCTGGCTTCCTGCCTGATCCAACTGA
CAACGACCACACCTTCGACGCGCTTCAAGCAACTCGTGGTGCAGTCGTTGCCAAATGGTG
GGAAAGCAGAACAGTCCGACCCCAGTACACCCGCACGCTCCTCTGGACCTCGTCGGGAA
AGGAGCAGCGTCTCACGTACCTGGTCGGCTGATACTCCTGTGTGTTGGCAACAACACTG
ATGTGGTCAACGTGTCAGTGCTGTGTCGCTGGAGTGTTGACTGAGCGTTCATCTCTTG
AGACACCTGAAGAGACCACCGCTCCCATCATGACACAAGGTTCCCTGTACAACGATTCCC
TTTCCACAAATGACTTCAAGTCCATCCTCCTAGGATCCACACCACTGGACATTGCCCTG
ATGGAGCAATCTTCCAGCTGGACCGTCCGCTGTCTATTGACTACAGCCTTGGAAGTGGAG
ATGTTGACCGTGCTGTTTACTGGCACCTCAAGAAGTTTGCTGGAAATGCTGGCACACCTG
CAGGCTGGTTTCGCTGGGGCATCTGGGA



TR.VNN.01.01-RNA1-Tüm Genom Nükleotid Dizisi

TAACATCACCTTCTTGCTCTGTTGAGTAATCACTTACGCAAGGTTACCGTTCAGCTTAGAC
AACGACAAGTCTACGCCNTGCGTCGCTTTGAGTTTGCACTCGCACGCATGTCTGGAGCAG
CATTTTGTGTGTACACAGGCTATCGCCTGTTGACCTCAAAATGGCTCGCGGACCGTGTCTG
AGGATTATCGCCAACGCGTCATCGCTGAGAAGAAACAAATTTCTCCGTGATGCGGCCACG
ATCCGGA CT CAGATCCAGCGGGAAATGGA ACTGGTGCGCATTTCCGTGCGCAAAGGCCA
TTCCCACCAGGAAGCTGCTACTGAGCGTAACAGCGCCACTGAGACCATGCTCGGTGTGGT
GGAGAAATGCGGCTACGAGCCGTATGTCATTTCCGCATCACCCCGTGAGGTTGGATACCA
CGGGTCACGTCAGTTCTATAGTCTGGCAGACTTTCCGCAAGACTACCGTCGTGATGACAT
CACCGACCGTCACATCATTGTGATGACTGATGTTGACTACTACGTGGACATGCATGAGTT
GATTGGTTTGGGTGTTCCGATATTGCTGTACACCTTCCAGCCAAGTACTGTGTCTGGGGA
GGTCAAGGATGGTTATTTTACCATCACTGACGACTCCGTTCACTACCGTGTGCTGGTGG
GAAGGATGTGCGCCATCGCATTTGGA ACTACA ACCAGGATACCATGTATGTGTCTCCCC
ACCTCGTGGTTTCTGGGCGAATCTGATGCAGATCTTGCGTGACATCACTGGTGTACCCGC
GATCTGTAGCTTTCTTTACACCAAGCTCGGTATTGCGCCCTTCGGCGACCGTGTACCATG
TTCACCGTTGATCAATTCAAGATGGGCGAACATCGTAACATCGTGTCAATTGTGCCCTTT
GCAACTTGCCGTTCAAACCTGCTCAAGATCAGTGAGTATGGTGCTGAGTTGGAGTATATG
CGTACCAACAGCGCAACAACATTGCCA ACTTCAACGCAGTCACCTACATCTCTGAGAAT
GGGCCACTCATCAGTCTGGGTTTGGAAAGGCAACTTTGCAAGCGTCCAGCTTCCCCTGCAG
GATTTGAGAACATCCGCACTGCATACGA ACTGTCCAAA ACTAACA ACTTGT CAGATACT
GTTTCGCCGGTCAGGGCGCCCGTGCAAGGAGGCAGCCATCATCCATAAATGTCTCCAAGC
CGAGTGCGCCGTGCTCAGCGAGGTGCTGCATAAACCTGGCGATCTTGCTCGTCATTACCA
AGCAGTTGGTAGTGCCTACGACACTGATCCAGCCGAGCAGGGCAAGTGTATGCTCGTG
AGTATGCTCCTGGACCGTTGACTCAA ACTGCTGTGTTTCCAAGTGAGTCACGTTCCAACG
AGCTTGCCACAATCGACGGTCGTATTGCTGGTCCGCAAGCCAAGGCAAAGAGCCGCGAG
CACATAACACCTAAGATGCGCAAAGTGGCTAGGGATTTCTGTGCACCATTTGGTGCCGATT
GCCGGCACTGGCCGTCCCTACCCCTCACGTATGTCGAGGAGCAGCAAACCAAGCCATTA
CAGCGGGCTCGGAATGATGCTAACC GATATCACGATGAGTTC ACTATGATGGTCAAAGC
GTTCCAAAAGAAAGAAGCATACAACGCCCCAAATTACCCAGGAACATTTCAACCGTTC
CGCACACCCAAAACGTCAAGTTGTCCAGCTACACCTACGCTTTCAAAGCCAGTGTTCTCC
AGCATGTTCCGTGGTACATGCCAACGCACACACCAGCGGAAATCGCTGACGCAGTGCAA
AACTTGGCCGCAAGTTCCACTGAGCTGGGTTGAAACTGACTACAGCAAGTTCGATGGCACA
TTCTTGCGCTTCATGCGTGAGTGCGTCAATTTGCCATTTATAAGCGCTGGGTTTCACTCG
ACCACTTGCCAGAGTTAACAACCTTATTGGCTAATGAGATCCAAGCACCTGCTGTTACAC
GACTGGGCATCAAGTACGATCCTGATTGCAGTCGCCTCAGTGGTTCTGCCCTCACGACAG
ACGGAACAGCATTGCTAATGCTTTCTGCTCATACCTTGCTGGTTCGCATGGCTGGCATGG
ATGATGATGAAGCTTGGTCTTGGATCGGCATTGTCTACGGTGATGATGGGCTCCGATCTG
GTAATGTTTCAAATGAGCTCCTCACCAACACTGCTTCTTCCCTCGGCTTTGACTTGAAAAT
AGTGAATCGCGCGCCACGTGGCTCTCCAGTGACATTTCTGTCTCGAGTATACCTCGATCC
TTGGTCTTCAACGGCTTCCGTGCAGTCGCCATTAAGAACATTATTGAAGTTGCACACCAC
CTGTGATACCCAGTCAGAGATCGACGACATTGGCTGGGCTAAGACACAGGCGTATTTGGT
CACTGATAGCAAGACACCTTTTATTGGTCACTGGTGCCGGGCTTATCGGAGAAATTGCAC
TGCACGTGTGGTTCAGTATGCAGACTACACTGACATTCCATTCTGGGTGAAGAAAGACGA
CCACGTTGGCAACTCGGGGCGCGAGTCTGAATCCBATGACTGGAMTGACSTTGTAGCCRA
CGAGCTTGGCGTCACCACCGCTGAGCTGYTGAAGCATCTTGCACTCCTGGATGCTTATAC
TGGTCCCATTAGTGGCCTCCACGTCTGACAACATCAATCGATTTGGAACCAAAGATGTC
TGTCGCATTAGACGGGAGATCCAAGCCGGTCTAGTCAGAAACAAA ACTAGCAAGGATG
GAACAAATCCAACAAGCGATCGATCAGCACCTCGTCGAGCTCGAGCAGCTCTTCCAGGT
GATGATGGACACGCGCGTCGCTCTCGGCGGAGTGACCGCGATCCAGGTAAACGAGATGC
GCACGTTTCGTGATAAGCGCCACGCGCGAGCTCGCCGCTGCACGTCTGTACGCGCGGT
TCCCACCCCTTCCAGCGGTGATCGAGGAACCGATGGAGACGGACTAGGCCGAGCTGCTG
TGCGTCAGCGTCATCGACGTCGCACTCAAGTGTAGACAGGTCACCTTGCTGCTCCCACCC
CCCGGGACCGTTTTTGGTCCCTTAATCAGCTTTANGGCGTCTTACCCTTCGAA

TR.VNN.01.02-RNA1-Tüm Genom Nükleotid Dizisi

TAACATCACCTTCTTGCTCTGTTGAGTAATCACTTACGCAAGGTTACCGTTCAGCTTAGAC
AACGACAAGTCTACGCCATGCGTCGCTTTGAGTTTGCACTCGCACGCATGTCTGGAGCAG
CATTTTGTGTGTACACAGGCTATCGCCTGTTGACCTCAAAATGGCTCGCGGACCGTGTCTG
AGGATTATCGCCAACGCGTCATCGCTGAGAAGAAACAAATTCTCCGTGATGCGGCCATG
ATCCGGA CT CAGATCCAGCGGGAAATGGA ACTGGTGCGCATTTCCGTGCGCAAAGGCCA
TTCCCACCAGGAAGCTGCTACTGAGCGTAACAGCGCCACTGAGACCATGCTCGGTGTGGT
GGAGAAATGCGGCTACGAGCCGTATGTCATTTCCGCATCACCCCGTGAGGTTGGATACCA
CGGGTCACGTCAGTTCTATAGTCTGGCAGACTTTCCGCCAAGACTACCGTCGTGATGACAT
CACCGACCGTCACATCATTGTGATGACTGATGTTGACTACTACGTGGACATGCATGAGTT
GATTGGTTTGGGTGTTCCGATATTGCTGTACACCTTCCAGCCAAGTACTGTGTCTGGGGA
GGTCAAGGATGGTTATTTTACCATCACTGACGACTCCGTTCACTACCGTGTGCTGGTGG
GAAGGATGTGCGCCATCGCATTTGGA ACTACA ACCAGGATACCATGTATGTGTCTCCCC
ACCTCGTGGTTTCTGGGCGAATCTGATGCAGATCTTGCGTGACATCACTGGTGTACCCGC
GATCTGTAGCTTTCTTTACACCAAGCTCGGTATTGCGCCCTTCGGCGACCGTGTACCATG
TTCACCGTTGATCAATTCAAGATGGGCGAACATCGTAACATCGTGTCAATTGTGCCCTTT
GCAACTTGCCGTTCAAACCTGCTCAAGATCAGTGAGTATGGTGCTGAGTTGGAGTATATG
CGTACCAACAGCGCAACAACATTGCCA ACTTCAACGCAGTCACCTACATCTCTGAGAAT
GGGCCACTCATCAGTCTGGGTTTGGAAAGGCAACTTTGCAAGCGTCCAGCTTCCCCTGCAG
GATTTGAGAACATCCGCACTGCATACGA ACTGTCCAAA ACTAACA ACTTGT CAGATACT
GTTTCGCCGGTCAGGGCGCCCGTGCAAGGAGGCAGCCATCATCCATAAATGTCTCCAAGC
CGAGTGCGCCGTGCTCAGCGAGGTGCTGCATAAACCTGGCGATCTTGCTCGTCATTACCA
AGCAGTTGGTAGTGCCTACGACACTGATCCAGCCGAGCAGGGCAAGTGTTATGCTCGTG
AGTATGCTCCTGGACCGTTGACTCAA ACTGCTGTGTTTCCAAGTGAGTCACGTTCCAACG
AGCTTGCCACAATCGACGGTCGTATTGCTGGTCCGCAAGCCAAGGCCAAGAGCCGCGAG
CACATAACACCTAAGATGCGCAAAGTG GCTAGGGATTTCTGTGCACCATTTGGTGCCGATT
GCCGGCACTGGCCGTCCCTACCCCTCACGTATGTCGAGGAGCAGCAAACCAAGCCATTA
CAGCGGGCTCGGAATGATGCTAACC GATATCACGATGAGTTC ACTATGATGGTCAAAGC
GTTCCAAAAGAAAGAAGCATACAACGCCCCAAATTACCCAGGAACATTTCAACCGTTC
CGCACACCCAAAACGTCAAGTTGTCCAGCTACACCTACGCTTTCAAAGCCAGTGTTCTCC
AGCATGTTCCGTGGTACATGCCAACGCACACACCAGCGGAAATCGCTGACGCAGTGCAA
AACTTGGCCGCAAGTTCCACTGAGCTGGGTTGAAACTGACTACAGCAAGTTCGATGGCACA
TTCTTGCGCTTCATGCGTGAGTGCGT CGAATTTGCCATCTATAAGCGCTGAAGTTTCACTGG
ACCACTTGCCAGAGTTAACAACCTTATTGGCTAATGAGATCCAAGCACCTGCTGTTACAC
GACTGGGCATCAAGTACGATCCTGATTGCAGTCGCCTCAGTGGTTCTGCCCTCACGACAG
ACGGAACAGCATTGCTAATGCTTTTCGTCTCATACCTTGCTGGTTCGCATGGCTGGCATGG
ATGATGATGAAGCTTGGTCTTGGATCGGCATTGTCTACGGTGATGATGGGCTCCGATCTG
GTAATGTTTCAAATGAGCTCCTCACCAACACTGCTTCTTCCCTCGGCTTTGACTTGAAAT
AGTGAATCGCGCGCCACGTGGCTCTCCAGTGACATTTCTGTCTCGAGTATACCTCGATCC
TTGGTCCTCACCGGCTTCCGTGCAGTCACCATTAAAGAACATTATTGAAGTTGCACACCAC
CTGTGATACCCAGTCAGAGATCGACGACATTGGCTGGGCTAAGACACAGGCGTATTTGGT
CACTGATAGCAAGACACCTTTTATTGGTCACTGGTGCCGGGCTTATCGGAGAAATTGCAC
TGCACGTGTGGTTCAGTATGCAGACTACACTGACATTCCATTCTGGGTGAAGAATGACGA
CCACGTTGGCAACTCGTGGCCGCACTCTGAATCCGATGACTGGAATGACGTTGTAGCCAA
CGAGCTTGGCGTCACCACCGCTGAGCTGTTGAAGCATCTTGCACTCCTGGATGCTTATAC
TGGTCCCATTAGTGGCCTCCACGTCTGACAACATCAATCGATTTGGAACCAAAGATGTC
TGTCGCATTAGACGGGAGATCCAAGCCGGTCTAGTCAGAACAAA ACTAGCAAGGATG
GAACAAATCCAACAAGCGATCGATCAGCACCTCGTCGAGCTCGAGCAGCTCTTCCAGGT
GATGATGGACACGCGCGTCGCTCTCGGCGGAGTGACCGCGATCCAGGTAAACGAGATGC
GCACGTTTCGTGATAAGCGCCACGCGCAGCTCGCCGCTGCACGTCTGTACGCGCGT
TCCCACCCCTTCCAGCGGTGATCGAGGAACCGATGGAGACGGACTAGGCCGAGCTGCTG
TGCGTCAGCGTCATCGACGTCGCACTCAAGTGTAGACAGGTCACCTTGCTGCTCCCACCC
CCTGG-ACCGTTTTGGTCCCTTAATCAGCTTTATGCTGTCTTACGCTTCG

TR.VNN.01.01-RNA2-Tüm Genom Nükleotid Dizisi

TAATCCATCACCGCTTTGCAATNACAATGGTACGCAAAGGTGAGAAGAAATTGGCAAAA
CCCGCGACCACCAAGGCCGCGAATCCGCAACCCCGCCGACGTGCTAACAATCGTCGGCG
TAGTAATCGCACTGACGCACCTGTGTCTAAGGCCTCGACTGTAAGTGGATTTGGACGTGG
GACCAATGACGTCCATCTCTCAGGTATGTCGAGAATCTCCCAGGCCGTCTCCCAGCCGG
GACAGGAACAGACGGATACGTTGTTGTTGATGCAACCATCGTCCCCGACCTCCTACCACG
ACTGGGACACGCTGCTAGAATCTTCCAGCGATACGCTGTTGAAACACTGGAGTTTGAAAT
TCAGCCAATGTGCCCCGCAAACACGGGCGGTGGTTACGTTGCTGGCTTCCTGCCTGATCC
AACTGACAACGACCACACCTTCGACGCGCTTCAAGCAACTCGTGGTGCAGTCGTTGCCAA
ATGGTGGGAAAGCAGAACAGTCCGACCCAGTACACCCGCACGCTCCTCTGGACCTCGT
CGGGAAAGGAGCAGCGTCTCACGTACCTGGTCCGGCTGATACTCCTGTGTGTTGGCAACA
ACACTGATGTGGTCAACGTGTCAAGTGTGTCGCTGGAGTGTTCGACTGAGCGTTCCAT
CTCTTGAGACACCTGAAGAGACCACCGCTCCCATCATGACACAAGGTTCCCTGTACAACG
ATTCCCTTTCCACAAATGACTTCAAGTCCATCCTCCTAGGATCCACACCACTGGACATTGC
CCCTGATGGAGCAATCTTCCAGCTGGACCGTCCGCTGTCTATTGACTACAGCCTTGGAAC
TGGAGATGTTGACCGTGCTGTTTACTGGCACCTCAAGAAGTTTGCTGGAAATGCTGGCAC
ACCTGCAGGCTGGTTTCGCTGGGGCATCTGGGACAACCTCAACAAGACGTTACAGATGG
CGTTGCCTACTACTCTGATGAGCAGCCCCGTCAAATCCTGCTGCCTGTTGGCACTGTCTGC
ACCAGGGTTGACTCGGAAAATAACCGGGTCATCCGGTTCCTAGTGCGTATCGTTGATG
ACCAATTTGAACAATTGATTAAAGCACTAACAATATAAATAAAGAAATACAAACAAAC
AAAACCTGAAATTGGAAAGAATAGAAGCGAAATTGAATCACTCGCTAGCAAATTAATGA
CAAAGCACCCAAGGAGGGTGCGATTGCTATTGTTGGTACCCTTGACGGCGTACCGGCTAC
GCTTGAAGGCCTATATACGGCTGGAAGCGCGCCGCGTGCTTAATTGGGTGCCAGTGGTAC
CAGTCGTATCCACCGCCGAGGAAATCCCTCTTTGGGCTGTTGGGTTACCGTTAGCTCCGC
GCAGTGAGCACCACCGCCATGTGGTCAAATGGCCGCTGATCGCT-TCTCAACTCGG

TR.VNN.01.02 -RNA2-Tüm Genom Nükleotid Dizisi

TAATCCATCACCGCTTTGCAATCACAATGGTACGCAAAGGTGAGAAGAAATTGGCAAAA
CCCGCGACCACCAAGGCCGCGAATCCGCAACCCCGCCGACGTGCTAACAATCGTCGGCG
TAGTAATCGCACTGACGCACCTGTGTCTAAGGCCTCGACTGTAAGTGGATTTGGACGTGG
GACCAATGACGTCCATCTCTCAGGTATGTCGAGAATCTCCCAGGCCGTCTCCCAGCCGG
GACAGGAACAGACGGATACGTTGTTGTTGATGCAACCATCGTCCCCGACCTCCTACCACG
ACTGGGACACGCTGCTAGAATCTTCCAGCGATACGCTGTTGAAACACTGGAGTTTGAAAT
TCAGCCAATGTGCCCCGCAAACACGGGCGGTGGTTACGTTGCTGGCTTCCTGCCTGATCC
AACTGACAACGACCACACCTTCGACGCGCTTCAAGCAACTCGTGGTGCAGTCGTTGCCAA
ATGGTGGGAAAGCAGAACAGTCCGACCCAGTACACCCGCACGCTCCTCTGGACCTCGT
CGGGAAAGGAGCAGCGTCTCACGTACCTGGTCCGGCTGATACTCCTGTGTGTTGGCAACA
ACACTGATGTGGTCAACGTGTCAAGTGTGTCGCTGGAGTGTTCGACTGAGCNTTCCGT
CTCTTGAGACACCTGAAGAGACCACCGCTCCCATCATGACACAAGGTTCCCTGTACAACG
ATTCCCTTTCCACAAATGACTTCAAGTCCATCCTCCTAGGATCCACACCACTGGACATTGC
CCCTGATGGAGCAATCTTCCAGCTGGACCGTCCGCTGTCTATTGACTACAGCCTTGGAAC
TGGAGATGTTGACCGTGCTGTTTACTGGCACCTCAAGAAGTTTGCTGGAAATGCTGGCAC
ACCTGCAGGCTGGTTTCGCTGGGGCATCTGGGACAACCTCAACAAGACGTTACAGATGG
CGTTGCCTACTACTCTGATGAGCAGCCCCGTCAAATCCTGCTGCCTGTTGGCACTGTCTGC
ACCAGGGTTGACTCGGAAAATAACCGGGTCATCCGGTTCCTAGTGCGTATCGTTGATG
ACCAATTTGAACAATTGATTAAAGCACTAACAATATAAATAAAGAAATACAAACAAAC
AAAACCTGAAATTGGAAAGAATAGAAGCGAAATTGAATCACTCGCTAGCAAATTAATGA
CAAAGCACCCAAGGAGGGTGCGATTGCTATTGTTGGTACCCTTGACGGCGTACCGGCTAC
GCTTGAAGGCCTATATACGGCTGGAAGCGCGCCGCGTGCTTAATTGGGTGCCAGTGGTAC
CAGTCGTATCCACCGCCGAGGAAATCCCTCTTTGGGCTGTTGGGTTACCGTTAGCTCCGC
GCA

Ek-4. Tez Çalışmasının RNA1 ve RNA2 Kısmi Nükleotid Dizilerine Göre Yapılan Filogenetik Çalışmalarında Kullanılan İzolatların Genbank Bilgileri

Sıra No	Erişim No		İzolat İsmi	Elde Edildiği Tür İsmi	Elde Edildiği Ülke	Örnekleme Tarihi	Genotip
	RNA1	RNA2					
1	JN189854	JN189941	487.1.2002	<i>Epinephelus marginatus</i>	Yunanistan	27.11.2002	RGNNV
2	JN189805	JN189959	406.2009	<i>Epinephelus costae</i>	Yunanistan	20.09.2009	RGNNV
3	JN189823	JN189975	550.2.2005	<i>Epinephelus sp</i>	Yunanistan	19.10.2005	RGNNV
4	JN189857	JN189946	06.01.2007	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Yunanistan	6.01.2007	RGNNV
5	JN189815	JN189920	250.1.2009	<i>Sparus aurata</i>	Güney Kıbrıs	16.07.2009	RGNNV/ SJNNV
6	JN189816	JN189968	316.2.2007	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Güney Kıbrıs	14.09.2007	RGNNV
7	JX194165	JX194164	12/050	<i>Epinephelus costae</i>	Cezayir	10.2011	RGNNV
8	AM085312	AM085335	DI-HR-96	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Hırvatistan	1996	SJNNV/ RGNNV
9	AM085311	AM085333	DI-I-98a	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	1998	RGNNV
10	AM085327	AM085342	DI-I-96a	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	1996	RGNNV
11	AM085318	AJ277804	DI-2	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	1998	RGNNV
12	AM085315	AJ277807	DI-5	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	1995	RGNNV
13	AM085321	AM085339	DI-I-98b	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	1998	RGNNV
14	AM085322	AM085340	Mb-I-00	<i>Mullus barbatus</i>	İtalya	2000	RGNNV
15	AM085314	AM085338	Sa-I-00	<i>Sparus aurata</i>	İtalya	2000	RGNNV
16	AM085328	AM085343	DI-I-02	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	2002	RGNNV
17	AM085329	AM085344	DI-I-98c	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	1998	RGNNV
18	AM085313	AJ277811	Uc-1	<i>Umbrina cirrosa</i>	İtalya	1996	RGNNV
19	AM085326	AJ277803	DI-1	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	2000	RGNNV
20	AM085323	AM085341	Ea-I-01	<i>Epinephelus aeneus</i>	İtalya	2001	RGNNV
21	AF319555	AF318942	GGNNV	<i>Epinephelus tauvina</i>	Singapur	-	RGNNV
22	AM085330	AM085345	JFIwa98	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Japonya	1998	BFNNV
23	AM085331	AY324870	SGWak97	<i>Epinephelus septemfasciatus</i>	Japonya	1997	RGNNV
24	AM085332	D38637	TPKag93	<i>Takifugu rubripes</i>	Japonya	1993	TPNNV
25	FJ789783	FJ789784	1	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Tunus	2010 (Yayın)	RGNNV
26	JN189798	JN189951	30.2.2007	<i>Mullus barbatus</i>	İtalya	10.12.2007	RGNNV
27	JN189803	JN189956	39.13.2009	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	29.07.2009	RGNNV
28	JN189876	JN190000	367.3.2005	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	06.07.2005	RGNNV
29	JN189893	JN190032	628.1.2005	<i>Salmo trutta trutta</i>	İtalya	10.11.2005	RGNNV
30	AB373028	AB373029	SG2001Nag	<i>Sevenband grouper</i> NNV	Japonya	2008 (Yayın)	RGNNV
31	AY721616	AY721615	Dragon grouper NNV	<i>Epinephelus lanceolatus</i>	Çin	2004 (Yayın)	RGNNV
32	AY690597	AY690596	G9508KS	<i>Redspotted grouper</i>	Tayvan	2004 (Yayın)	RGNNV
33	JN189891	JN190003	505.6	<i>Mullus barbatus</i>	İtalya	2004	RGNNV

EK-4. (Devam) Tez Çalışmasının RNA1 ve RNA2 Kısmi Nükleotid Dizilerine Göre Yapılan Filogenetik Çalışmalarında Kullanılan İzolatların Genbank Bilgileri

Sıra No	Erişim No		İzolat İsmi	Elde Edildiği Tür İsmi	Elde Edildiği Ülke	Örnekleme Tarihi	Genotip
	RNA1	RNA2					
34	JN189879	JN190025	401.4	<i>Mullus barbatus</i>	İtalya	2004	RGNNV
35	JN189881	JN190026	412.2	<i>Mullus spp.</i>	İtalya	2000	RGNNV
36	JN189880	JN190013	406.2	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	2005	RGNNV
37	JN189859	JN190005	13.02	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	2003	RGNNV
38	JN189908	JN190022	348.3	<i>Solea solea</i>	İtalya	2003	RGNNV
39	JN189906	JN190009	310	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	2003	RGNNV
40	JN189852	JN189948	380	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İspanya	2008	RGNNV
41	AM085326	AJ277803	DI-1	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	2000	RGNNV
42	JN189896	JN190033	80.1.5	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	2005	RGNNV
43	JN189849	JN189939	339	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Yunanistan	2002	RGNNV
44	JN189850	JN189915	340.1	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Hırvatistan	2001	RGNNV
45	JN189909	JN189936	367.2	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	2005	RGNNV
46	JN189855	JN189917	58.1	<i>Sparus aurata</i>	Portekiz	2005	RGNNV/ SJNNV
47	JN189853	JN189943	410	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İspanya	2006	RGNNV
48	JN189821	JN189973	385	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İspanya	2007	RGNNV
49	JN189836	JN189983	334.1	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İspanya	2009	RGNNV
50	JN189812	JN189966	570.21	<i>Mullus barbatus</i>	İtalya	2008	RGNNV
51	JN189804	JN189958	402.5	<i>Umbrina cirrosa</i>	İtalya	2009	RGNNV
52	JN189870	JN190010	318.1	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	2009	RGNNV
53	JN189873	JN189997	338	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	2008	RGNNV
54	JN189867	JN189994	288	<i>Umbrina cirrosa</i>	İtalya	2009	RGNNV
55	JN189894	JN190034	80	<i>Chelon labrosus</i>	İtalya	2001	RGNNV
56	JN189875	JN189999	363	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	20.10.2006	RGNNV
57	AM085317	-	DI-I-96b	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	1996	SJNNV
58	AJ401165	-	AH99NorA	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Norveç	1999	BFNNV
59	EF617330	EF617329	Ac06NorT	<i>Gadus morhua</i>	Norveç	2006	BFNNV
60	EU826137	D38635	BF93Hok	<i>Verasper moseri</i>	Japonya	1993	BFNNV
61	JQ970428	JQ970431	265.2009	<i>Sander lucioperca</i>	İtalya	07.2009	RGNNV
62	JQ970429	JQ970432	243.1.2009	<i>Micropterus salmoides</i>	İtalya	07.2009	RGNNV
63	JQ970430	JQ970433	336.1.2009	<i>Morone saxatilis x Morone chrysops</i>	İtalya	09.2009	RGNNV
64	JN189865	JN189992	283.2009	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	10.12.2009	RGNNV

Ek-5. Tez Çalışmasının RNA1 ve RNA2 Tüm Genom Nükleotid Dizilerine Göre Yapılan Filogenetik Çalışmalarında Kullanılan İzolatların Genbank Bilgileri

Sıra No	Erişim No		İzolat İsmi	Elde Edildiği Tür İsmi	Elde Edildiği Ülke	Örnekleme Tarihi	Genotip
	RNA1	RNA2					
1	EF558368	EF558369	China 1	<i>Epinephelus akaara</i>	Çin	2012 (Yayın)	RGNNV
2	AY721616	AY721615	Dragon grouper NNV	<i>Epinephelus lanceolatus</i>	Çin	2004 (Yayın)	RGNNV
3	JN189865	JN189992	283.2009	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	10.08.2009	RGNNV
4	JN189909	JN189936	367.2.2005	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	06.07.2005	RGNNV/ SJNNV
5	JN189814	JN189919	484.2.2009	<i>Solea senegalensis</i>	İspanya	23.11.2009	SJNNV
6	AF319555	AF318942	Singapore	<i>Epinephelus tauvina</i>	Singapur	2001 (Yayın)	RGNNV
7	MG874757	MG874758	HN1	<i>Epinephelus coioides</i>	Çin	12.06.2016	RGNNV
8	AB373028	AB373029	SG2001Nag	<i>Hyporthodus septemfasciatus</i>	Japonya	2007 (Yayın)	RGNNV
9	KF386163	KF386164	389/I96	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	1996	SJNNV/ RGNNV
10	EF617330	EF617329	Ac06NorT	<i>Atlantic cod</i>	Norveç	2007 (Yayın)	BFNNV
11	EF617331	EF617328	Ac06NorE	<i>Atlantic cod</i>	Norveç	2007 (Yayın)	BFNNV
12	EU826137	EU826138	BF93Hok	<i>Barfin flounder</i>	Japonya	2008 (Yayın)	BFNNV
13	KP455643	KP455642	SBN147	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Çin	10.07.2014	RGNNV
14	KM095958	KM095959	SGYeosu08	<i>Epinephelus septemfasciatus</i>	Güney Kore	2008	RGNNV
15	EU236148	EU236149	TPKag93	<i>Tiger puffer</i>	Japonya	2007 (Yayın)	TPNNV
16	FJ789783	FJ789784	1	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Tunus	2009 (Yayın)	RGNNV
17	EU236146	EU236147	JFIwa98	<i>Barfin flounder</i>	Japonya	2007 (Yayın)	BFNNV
18	MF144242	MF144241	KS1	<i>Epinephelus coioides</i>	Tayvan	01.06.2013	RGNNV
19	AY324869	AY324870	SGWak97	<i>Epinephelus septemfasciatus</i>	Japonya	1997	RGNNV
20	NC_003448			<i>Striped jack</i>		2001 (Yayın)	SJNNV
21	AJ401165		AH99NorA	<i>Atlantic halibut</i>	Norveç	2000 (Yayın)	BFNNV
22	FJ748760		JFNNV-WD	<i>Japanese flounder</i>	Güney Kore	2009 (Yayın)	RGNNV
23	EF617335		Ac06NorPpB	<i>Atlantic cod</i>	Norveç	2008 (Yayın)	BFNNV
24	EF617334		Ac06NorPpA	<i>Atlantic cod</i>	Norveç	2008 (Yayın)	BFNNV
25	EF617333		Ac06NorPmB	<i>Atlantic cod</i>	Norveç	2008 (Yayın)	BFNNV
26	EF617332		Ac06NorPmA	<i>Atlantic cod</i>	Norveç	2008 (Yayın)	BFNNV
27	AY369136		RGNNV		Çin	P2003	RGNNV
28	JQ073720		LCNNV-In01	<i>Lates calcarifer</i>	Hindistan	06.10.2006	RGNNV
29		KM588181	GGNNV20131 122	<i>Epinephelus lanceolatus</i>	Tayvan	30.08.2013	RGNNV

EK-5. (Devam) Tez Çalışmasının RNA1 ve RNA2 Tüm Genom Nükleotid Dizilerine Göre Yapılan Filogenetik Çalışmalarında Kullanılan İzolatların Genbank Bilgileri

Sıra No	Erişim No		İzolat İsmi	Elde Edildiği Tür İsmi	Elde Edildiği Ülke	Örnekleme Tarihi	Genotip
	RNA1	RNA2					
30		MG637439	ZN521	<i>pearl gentian grouper</i>	Çin	21.07.2017	RGNNV
31		EF617327	Ac06NorPp	<i>Atlantic cod</i>	Norveç	2007 (Yayın)	BFNNV
32		EF617326	Ac06NorPm	<i>Atlantic cod</i>	Norveç	2007 (Yayın)	BFNNV
33		GU826692	BVN2	<i>Lates calcarifer</i>	Hindistan	12.2008	RGNNV
34		AY835642	White star snapper NNV	<i>Lutjanus stellatus</i>	Tayvan	2004 (Yayın)	RGNNV
35		JF412273	BVN16	<i>Lates calcarifer</i>	Hindistan	2011 (Yayın)	RGNNV
36		GU953669	BVN4	<i>Lates calcarifer</i>	Hindistan	08.2009	RGNNV
37		AY690596	G9508KS	<i>Redspotted grouper NNV</i>	Tayvan	2004 (Yayın)	RGNNV
38		AF534998	<i>Epinephelus coioides</i> NNV	<i>Epinephelus coioides</i>	Çin	2003 (Yayın)	RGNNV
39		HM485328	VNIN	<i>Lates calcarifer</i>	Hindistan	10.2006	RGNNV
40		AY744705	Redspotted grouper NNV	<i>Epinephelus akaara</i>	Çin	2007 (Yayın)	RGNNV
41		AJ608266	Turbot nodavirus	<i>Scophthalmus maximus</i>	Norveç	2003 (Yayın)	TNV

Ek-6. Tez Çalışmasında Akdeniz İzolatlarının Kapsid Protein (RNA2 ORF) Tüm Genom Nükleotid Dizilerine Göre Yapılan Filogenetik Çalışmalarda Kullanılan İzolatların Genbank Bilgileri

Sıra No	Erişim No	İzolat İsmi	Elde Edildiği Tür İsmi	Elde Edildiği Ülke	Örnekleme Tarihi	Genotip
1	KC696562	SpPm-IAusc1586.10	<i>Psetta maxima</i>	İspanya	28.12.2010	RGNNV
2	FJ829452	SpDI_IAusc168808	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İspanya	15.06.2008	RGNNV
3	AY284967	EA-150102-IL	<i>Epinephelus aeneus</i>	İsrail	2004 (Yayın)	RGNNV
4	KY354694	425-10	<i>Sparus aurata</i>	İtalya	09.2008	RGNNV
5	AY284965	EA-221199-IL	<i>Epinephelus aeneus</i>	İsrail	2004 (Yayın)	RGNNV
6	Y08700	-	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Yunanistan	1996	RGNNV
7	AY284971	DL-040700-IL	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İsrail	2004 (Yayın)	RGNNV
8	AY284972	DL-060900-GR	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Yunanistan	2004 (Yayın)	RGNNV
9	AJ698093	V26	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Fransa	2004 (Yayın)	RGNNV

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Murat
Soyadı : KAPLAN
Doğum Yeri ve Tarihi : Balıkesir – Merkez, 15.06.1982
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Medeni Durumu : Evli
Askerlik Durumu : Yedek Subay, Güney Deniz Saha K.'lığı/İzmir.
311. Dönem
İletişim Adresi ve Telefonu : kaplanmurat10@gmail.com / 0544 232 84 82

II- Eğitimi

Plevne İlkokulu / BALIKESİR
Mehmetçik İlköğretim Okulu / BALIKESİR
Samsun Veteriner Sağlık Meslek Lisesi / SAMSUN
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 1999-2004
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2010-2015
Yabancı Dil: İngilizce (YDS-2015 Eylül: 77,5; YÖKDİL-22.09.2018: 92,5)

III- Ünvanları

Veteriner Sağlık Teknisyeni (1999)
Veteriner Hekim (2004)
Doktor (2015)

IV- Mesleki Deneyimi

1. Karkamış İlçe Tarım Müdürlüğü/GAZİANTEP, 2003-2006
2. Malazgirt İlçe Tarım Müdürlüğü/MUŞ, 2006-2009
3. Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü/ANKARA, 2009-2011
4. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Doktora, 2010-2015
5. İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, 2011-Halen
6. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Viroloji Anabilim Dalı, Doktora Öğrencisi, 2013-Halen

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Hekimler Derneği

Veteriner Hekimler Odası

ABSA (American Biological Safety Association)

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları (SCI ve SCI expanded)

1. KAPLAN M, YILDIZ G (2017). The effects of dietary supplementation levels of valine on performance and immune System of broiler chickens. *Journal of Agricultural and Crop Research*, Vol. 5 (2): 25-31
2. KALAYCI G, ÖZKAN B, PEKMEZ K, KAPLAN M, MEFUT A and ÇAĞIRGAN AA (2018). First detection of Cyprinid herpesvirus-2 (CyHV-2) followed by screening and monitoring studies in Goldfish (*Carassius Auratus*) in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **38(4)**: 94-103.
3. KALAYCI G, ÇAĞIRGAN AA, PEKMEZ K, ÖZKAN B, KAPLAN M (2019). Molecular detection and phylogenetic analysis of the honeybee (*Apis mellifera*) sacbrood virus in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci.* **43**: 551-554.

Diğer Yayınları

1. KAPLAN M, YILDIZ G (2012). Kanatlılarda Protein ve Amino Asitlerin İmmun Sistem Üzerine Etkisi. *Mektup Ankara*, ISSN:1309 7296. **10 (4)**: 3-12.
2. KAPLAN M, YILDIZ G. (2015). Broyler beslenmesinde Valinin Önemi, *Yem Magazin*, **Yıl 23 Sayı 72**: 29-37.
3. KAPLAN M, KARAOĞLU MT (2018). Viral Balık Hastalıkları İle Mücadelede Ulusal ve Uluslararası Mevzuatlar. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 35(3): 353-360.

Sözlü ve Poster Sunumları

1. KAPLAN M, YILDIZ G (2015) Etlik Piliç Rasyonlarına Farklı Düzeylerde İlave Edilen Valin Amino Asidinin Besi Performansı ve İmmun Sistem Üzerine Etkisi. 3.Uluslararası Beyaz Et Kongresi'ne (3rd International Poultry Meat Congress). 22-26 Nisan 2015, Starlight Convention Center & Sunrise Park Resort, Antalya (**PN: 19**)
2. KALAYCI G, PEKMEZ K, KAPLAN M, ÖZKAN B, KÜÇÜKALİ Y (2015), Investigation of Ovine Herpesvirus-2 in Sheep, X. Internatinonal Congress for Veterinary Virology, Montpellier, France (Poster, **PN: 268**)
3. KALAYCI G, KAPLAN M, PEKMEZ K, ÖZKAN B, KÜÇÜKALİ Y (2015), Virological Investigations in Clinical Infected Wild Goats (*Capra aegagrus aegagrus*) in Western of Turkey, X. Internatinonal Congress for Veterinary Virology, Montpellier, France (Poster, **PN: 276**)

4. KALAYCI G, PEKMEZ K, KAPLAN M, ÖZKAN B, TÜRKMEN R (2016) Ege Bölgesinde Akabane Hastalığı, XII. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, Kapadokya/Nevşehir, 30 Ağustos – 02 Eylül 2016 (Poster Bildiri, **P34**)
5. KALAYCI G, PEKMEZ K, KAPLAN M, ÖZKAN B (2016) Türkiye’de Caprine Herpes Virus-2 Varlığının Araştırılması, XII. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, Kapadokya/Nevşehir, 30 Ağustos – 02 Eylül 2016 (Sözlü Sunum, **O27**)
6. KALAYCI G, ÖZKAN B, PEKMEZ K, KAPLAN M (2016) Türkiye’de Gökkuşaklı Alabalıklarında İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis Hastalığının Durumu, XII. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, Kapadokya/Nevşehir, 30 Ağustos – 02 Eylül 2016 (Sözlü Sunum, **O45**)
7. KALAYCI G, KAPLAN M, PEKMEZ K, ÖZKAN B (2016) Ruminant Solunum Sistemi Virüslerinin İzolasyon ve İdentifikasyonu, XII. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, Kapadokya/Nevşehir, 30 Ağustos – 02 Eylül 2016 (Poster Bildiri, **P53**)
8. KALAYCI G, ÖZKAN B, PEKMEZ K, KAPLAN M (2016) Levrek ve Çipura Kuluçkahanelerinde Viral Nervöz Nekrozis Hastalığının Durumu, XII. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, Kapadokya/Nevşehir, 30 Ağustos – 02 Eylül 2016 (Poster Bildiri, **P35**)
9. KAPLAN M, MORLAND M (2018) Establishment and Training of Biorisk Management Committee for the İzmir Bornova Veterinary Control Institute, 61st Annual Biological Safety (ABSA) Conference, Charleston/South Carolina (SC)/United States, 12-17 Ekim 2018 (Poster Bildiri)
10. KARAGÜL MS, KAPLAN M, ÇÖVEN F, DAKMAN A, PINARD WJ (2018) Evaluation of The Biorisk Management Training for The Researchers Working with Biohazard Agents, 2nd International Congress of Veterinary Microbiology, Sherwood Breezes Resort, Lara/Antalya, 16 – 19 Ekim 2018 (O9, Abstract ID: 32)
11. KALAYCI G, ÖZKAN B, PEKMEZ K, KAPLAN M, MEFUT A, ÇAĞIRGAN AA (2018) First Detection of Cyprinid Herpesvirus-2 (Cyhv-2) Followed by Screening and Monitoring Studies in Goldfish (Carassius Auratus) in Turkey, 2nd International Congress of Veterinary Microbiology, Sherwood Breezes Resort, Lara/Antalya, 16 – 19 Ekim 2018 (O69, Abstract ID: 169)
12. KALAYCI G, ÇAĞIRGAN AA, PEKMEZ K, ÖZKAN B, KAPLAN M, BEYAZIT A, YEŞİLÖZ H (2018) Viral Etiology in Bee Diseases, 2nd International Congress of Veterinary Microbiology, Sherwood Breezes Resort, Lara/Antalya, 16 – 19 Ekim 2018 (O60, Abstract ID: 172)
13. KALAYCI G, KAPLAN M, ÖZKAN B, PEKMEZ K, ÇAĞIRGAN AA (2018) The Investigation of Viral Nervous Necrosis Virus in Bivalve Molluscs in Turkey, 2nd International Congress of Veterinary Microbiology, Sherwood Breezes Resort, Lara/Antalya, 16 – 19 Ekim 2018 (P49, Abstract ID: 171)

14. KALAYCI G, PEKMEZ K, ÇAĞIRGAN AA, KAPLAN M, ÖZKAN B, (2018) Ecthyma Cases in Aegean Region, 2nd International Congress of Veterinary Microbiology, Sherwood Breezes Resort, Lara/Antalya, 16 – 19 Ekim 2018 (P48, Abstract ID: 170)

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Projeler

Proje Adı	Destekleyen Kuruluş	Projedeki Görevi	Başlangıç ve Bitiş Tarihleri
Süt Sığırcılığı Projesi SRAP (Sosyal Riski Azaltma Projesi)	Dünya Bankası- Gaziantep/Karkamış Kaymakamlığı	Proje Hazırlayıcı ve Yürütücüsü	2005-2006
Koyunculuk Projesi SRAP (Sosyal Riski Azaltma Projesi)	Dünya Bankası- Gaziantep/Karkamış Kaymakamlığı	Proje Hazırlayıcı ve Yürütücüsü	2005-2006
Broyler Rasyonlarına İlave Edilen Farklı Düzeylerdeki Valinin immun Sistem Üzerindeki Etkisi	Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	Yardımcı Araştırmacı	06.12.2014 - 07.01.2015
Türkiye’de Vektör Kaynaklı Önemli Viral Hayvan Hastalıklarının (Mavi dil- BT, Epizootik Hemorajik Ateş- EHD, Üç Gün Hastalığı-BEF ve AKABANE) Teşhisi, Vektörlerin Tespiti ve Erken Uyarı Sisteminin Oluşturulması	TAGEM	Araştırmacı	01/01/2015 - Halen
Türkiye’de Alabalık Yetiştiriciliği Yapılan İşletmelerde Salmonid Alphavirus Enfeksiyonunun Varlığının Araştırılması	TAGEM	Araştırmacı	01/01/2016 – 31/12/2018
Ege Bölgesinde Visna/Maedi ve Caprine Arthritis Encephalitis Enfeksiyonlarının Yaygınlığının Araştırılması	TAGEM	Araştırmacı	01/01/2017 - 31/12/2018
Establishment and Training of Biorisk Management Committee for the İzmir Bornova Veterinary Control Institute. International Twinning Round VI	SNL (Sandia National Laboratories) – DTRA (Defense Threat Reduction Agency, GTHB	Proje Lideri ve Yürütücüsü	Kasım 2017 –Haziran 2018

Seminerler

1. Hayvanların Nakillerde Beslenmesi ve Refahı, A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2011.
2. Kanatlılarda Protein ve Amino Asitlerin İmmun Sistem Üzerine Etkisi, A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2012.
3. Viral Tanı Amaçlı Örnekleme ve Tanı Yöntemleri, A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2014.
4. Balıkların Viral Hastalıkları, Kontrol ve Mücadele Mevzuatı, A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2015 .

VIII- Diğer Bilgiler

Aldığı Sertifikalar ve Eğitimler

1. Sığırlarda Recto-Vaginal Metotla Suni Tohumlama, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı/Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara, 09 - 13 Mayıs 2005.
2. Gıda Kontrolör Kursu, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Gaziantep, 30 Mayıs – 03 Haziran 2005.
3. Kişisel ve Kurumsal Gelişim Eğitimi, Vizyon Akademi, Ankara, 11-24 Ocak 2010.
4. Epidemiology, Şap Mücadele Projesi/KKGM, Bolu, 01-04 Şubat 2010.
5. Epidemiosurveillance, Şap Mücadele Projesi/KKGM, Ankara, 08-11 Şubat 2010.
6. Simulation on FMD, Şap Mücadele Projesi/KKGM, Van, 14-18 Haziran 2010
7. Introduction to ArcGIS (Coğrafi Koordinat Sistemleri), Environmental Systems Research Institute (ESRI), Ankara, 16-20 Ağustos 2010.
8. Cost Benefit Analysis, Şap Mücadele Projesi/KKGM, Ankara, 15-17 Eylül 2010.
9. PPR Aşılması ve Koyun-Keçi Kimliklendirilmesi-Eğiticilerin Eğitimi, Koyun ve Keçilerin Küpelenmesi ve Aşılması Projesi, Ankara, 21 Eylül 2010.
10. Kuş Gribi Gerçek Boyutlu Saha Tatbikatı ve Salgın Yönetimi Eğitimi, T.C. Sağ. Bak-Temel Sağ. Hiz. Gn. Md. / T.C. TKB-KKGM, İzmir, 01-05 Kasım 2010.
11. Basic Veterinary Epidemiology Training Workshop, Colorado State University/USDA, Sirena Belek Hotel, Belek/Antalya, 24-28 Ocak 2011.
12. Advanced Veterinary Epidemiology Training Workshop, Colorado State University/USDA, Sirena Belek Hotel, Belek/Antalya, 14-18 Şubat 2011.
13. Expert Mission on Good Manufacturing Practices- Turkey (GMP), Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü/TAIEX, Ankara, 28-30 Kasım 2011.
14. Arı Sağlığı, JVL Consulting/BTSF/DG-SANCO, Prag/Çek Cumhuriyeti, 06-09 Eylül 2011.

15. Biological Safety Cabinet and Working in a BSL3, Colorado State University, Fort Collins/Colorado/A.B.D., 25 Ocak 2012.
16. Arı Hastalıkları, Colorado State University, Fort Collins/Colorado/A.B.D., 30 Aralık 2011 - 30 Ocak 2012.
17. The Application of Epidemiology & Risk Assessment of Economically Important Bee Diseases, Colorado State University, Fort Collins/Colorado/A.B.D., Ocak 2012.
18. Early and Rapid Nuclear and Nuclear – Related Diagnostic and Tracing Technologies for African and Classical Swine Fever, IAEA (International Atomic Energy Agency), Seibersdorf/Viyana/AVUSTURYA, 21-25 Mayıs 2012.
19. Hayvan ve Hayvansal Ürünlerin İthalat Prosedürleri, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Çeşme/İzmir, 06-08 Haziran 2012.
20. Early and Rapid Nuclear and Nuclear – Related Diagnostic and Tracing Technologies for West Nile Fever, Hepatit E and Equine Infectious Anaemia, IAEA (International Atomic Energy Agency) / İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir, 08 - 19 Ekim 2012.
21. TS-EN ISO 17025 Kalibrasyon ve Laboratuvar Akreditasyon Yönetim Sistemleri, Elginkan Vakfı, Manisa, 21.02.2013.
22. Lisansüstü Öğrencileri Oryantasyon Programı, Ege Üniversitesi-Ebitem Teknoloji Transfer Ofisi, İzmir, 25-27 Eylül 2013.
23. Genel Metroloji ve Kalibrasyon Eğitimi, Makine Mühendisleri Odası Kalibrasyon Laboratuvarı ve Metroloji Eğitim Merkezi, İzmir, 17 Ekim 2014.
24. Epidemiyoloji Eğitimi, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü-Pendik/İstanbul, 16 – 20 Mart 2015.
25. Lumpy Skin Diseases (Sığırların Nodüler Ekzantemi Hastalığı), İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü-Pendik/İstanbul, 09 – 10 Nisan 2015.
26. Epidemiyoloji Eğitimi (Epidemiyolojik İstatistikler), Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü/EuFMD, İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü-Pendik/İstanbul, 12 – 16 Ekim 2015.
27. Epidemiyoloji Eğitimi (Hayvan Hastalıklarının Kontrolünde Risk Analizi), Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü/EuFMD, İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü-Pendik/İstanbul, 21 – 25 Mart 2016.
28. Epidemiyolojik Sörveyler: Planlama, Uygulama ve Analiz, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü / EuFMD, İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü-Pendik/İstanbul, 23 – 27 Mayıs 2016.
29. Epidemiyoloji Eğitimi (Salgın Araştırması), Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü/EuFMD, İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü-Pendik/İstanbul, 19 – 23 Eylül 2016.
30. Türkiye'nin Batı Bölgelerinde Şap Hastalığının Riskinin Azaltılması Çalıştayı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü / EuFMD, Çeşme/İzmir, 21 – 25 Kasım 2016.

31. High-Containment Laboratory Practices and Techniques (Yüksek Riskli Laboratuvar Uygulamaları ve Teknikleri), Kansas State University – Biosecurity Research Institute/APHIS-USDA, Manhattan/Kansas/A.B.D., 09 – 13 Ocak 2017.
32. Orientation to Biorisk Management Course (Biyorisk Yönetimi Kursu Oryantasyonu), SNL (Sandia National Laboratories) – DTRA(Defense Threat Reduction Agency, Albuquerque/New Mexico/A.B.D., 23 – 27 Ocak 2017.
33. Biorisk Management Trainer Development Program (Biyorisk Yönetimi Eğitici Geliştirme Programı), SNL (Sandia National Laboratories) – DTRA(Defense Threat Reduction Agency, Albuquerque/New Mexico/A.B.D., 20 – 24 Mart 2017.
34. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitimi, İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, Bornova/İzmir, 06 – 17 Mart 2017.
35. EuFMD online course Foot-and-Mouth Disease Socio-economic Impact Assessment, 24 Saat (6 Hafta), Haziran 2017.
36. Kuruluş İçi Kalite Denetçisi Eğitimi, Elginkan Vakfı, Manisa, 11.09.2017.
37. ISO/IEC 17043 Yeterlilik Testleri İçin Genel Şartlar, Uzman Laboratuvar Akredidasyon Danışmanlık Ltd. Şti., İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, Bornova/İzmir, 18 Ekim 2017.
38. ISO/IEC 13528 Yeterlilik Testleri İstatistik Hesaplamalar, Uzman Laboratuvar Akredidasyon Danışmanlık Ltd. Şti., İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, Bornova/İzmir, 19 Ekim 2017.
39. Temel Biyoenformatik, Primer Tasarımı ve Filogenetik Analiz, Ankara Üniversitesi Evrimsel Genetik Laboratuvarı (eGL) ve Enigma Biyoteknoloji, İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, Bornova/İzmir, 24 - 26 Ekim 2017.
40. EuFMD in-depth online course Risk Analysis along the Value Chain, 24 Saat (6 Hafta), Kasım 2017.
41. Shipping Infectious Substances Certification Course, ABSA (American Biological Safety Association), Charleston/South Carolina (SC)/United States, 12 Ekim 2018.
42. Advance BSL-3 Facility Operations, ABSA (American Biological Safety Association), Charleston/South Carolina (SC)/United States, 13 Ekim 2018.
43. Pathogen Inactivation Methods for Laboratory Applications ABSA (American Biological Safety Association), Charleston/South Carolina (SC)/United States, 14 Ekim 2018.
44. Professional Certification in Biorisk Management, International Federation of Biosafety Associations (IFBA), 18 Nisan 2019.

Verdiği Eğitimler

1. Mihrak Araştırması, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, İzmir, 01 – 02 Mart 2017 (15 Kişi).
2. Introduction to Biorisk Management Workshop (Biyorisk Yönetimi'ne Giriş Çalıştayı), SNL (Sandia National Laboratories) – DTRA (Defense Threat Reduction Agency, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Sağlık Bakanlığı, Ankara, 22 – 26 Mayıs 2017 (20 Kişi).
3. Introductory Laboratory Biorisk Management Training (Laboratuvar Biorisk Yönetimi'ne Giriş Eğitimi), SNL (Sandia National Laboratories) – DTRA (Defense Threat Reduction Agency, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Sağlık Bakanlığı, Antalya, 05 - 09 Şubat 2018 (20 Kişi).
4. Biorisk Yönetimine Giriş Eğitimi, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, İzmir, 05 – 08 Mart 2018 (13 Kişi).
5. Biorisk Management Trainer Development Program (Biyorisk Yönetimi Eğitmen Geliştirme Programı), SNL (Sandia National Laboratories) – DTRA (Defense Threat Reduction Agency, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Antalya, 12 - 16 Mart 2018 (7 Kişi).
6. Introductory Laboratory Biorisk Management Training (Laboratuvar Biorisk Yönetimi'ne Giriş Eğitimi), SNL (Sandia National Laboratories) – DTRA (Defense Threat Reduction Agency, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Antalya, 07 - 11 Mayıs 2018 (20 Kişi).
7. Biorisk Yönetimine Giriş Eğitimi, Tarım ve Orman Bakanlığı, İzmir, 26 – 29 Kasım 2018 (16 Kişi).

Bilimsel Toplantılar (Yurt İçi)

1. Animal Welfare on Poultry, TAIEX, Ankara, 05 Ekim 2010.
2. III. Uluslararası Beyaz Et Kongresi, BEST-BİR, Antalya, 22 – 26 Nisan 2015.
3. XII. Ulusal Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Derneği, Kapadokya/Nevşehir, 30 Ağustos – 02 Eylül 2016.

Bilimsel Toplantılar (Yurt Dışı)

1. Researching Animals-Welfare, TAIEX, Zagreb/Hırvatistan, 05-06 Mayıs 2010.
2. OIE Global Conference on Wildlife/ Animal Health and Biodiversity-Preparing for the Future, OIE, Paris/Fransa, 23-25 Şubat 2011.
3. X. International Congress of Veterinary Virology, ESVV 2015, Montpellier, France, 31 Ağustos-3 Eylül 2015.
4. 9. Annual Meeting of EPIZONE, Montpellier, France, 2-3 Eylül 2015.
5. 17th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, 7-11 Eylül 2015.

6. 61st Annual Biological Safety (ABSA) Conference, Charleston/South Carolina (SC)/United States, 12-17 Ekim 2018.

Organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar

1. Animal Welfare on Poultry, TAIEX, Ankara, 05 Ekim 2010.
2. OIE Platform on Animal Welfare for Europe - 9th meeting of the Steering Group (SG9) - Izmir, 7-8 Aralık 2017.

