



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK VİROLOJİSİ ANA BİLİM DALI**

**KARADENİZ'DE AVLANAN BALIKLARDA
BETANODAVİRUS ENFEKSİYONUNUN EPİDEMİYOLOJİSİ**

Doktora Tezi

Bahadır MÜFTÜOĞLU

Danışman
Prof. Dr. Harun ALBAYRAK

SAMSUN
2023

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK VİROLOJİSİ ANA BİLİM DALI**



**KARADENİZ'DE AVLANAN BALIKLARDA
BETANODAVİRUS ENFEKSİYONUNUN EPİDEMİYOLOJİSİ**

Doktora Tezi

Bahadır MÜFTÜOĞLU

Danışman

Prof. Dr. Harun ALBAYRAK

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.20.005 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

05 /12/ 2022
Bahadır MÜFTÜOĞLU

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : KARADENİZ'DE AVLANAN BALIKLARDA
BETANODAVİRUS ENFEKSİYONUNUN EPİDEMİYOLOJİSİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 05.12.2022 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 7

Tek kaynak oranı : % 3 çıkmıştır.

05 /12 / 2022
Prof. Dr. Harun ALBAYRAK

ÖZET

KARADENİZ’DE AVLANAN BALIKLARDA BETANODAVİRUS ENFEKSİYONUNUN EPİDEMİYOLOJİSİ

Bahadır MÜFTÜOĞLU
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Veterinerlik Virolojisi Ana Bilim Dalı
Doktora, Şubat/2023
Danışman: Prof. Dr. Harun ALBAYRAK

Dünyada Viral Nervöz Nekrozis (VNN) viral hastalıklar arasında önemli bir konumdadır ve salgınlarla büyük kayıplara neden olmaktadır. Türkiye’de Karadeniz’de yabani hayatla ilgili bir VNN çalışması bulunmamaktadır. Bu sebeple; Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinde 6 ilde doğal yolla avlanan 8 balık türünde VNN viral nükleik asidi yönünden araştırma yapıldı. Sinop, Samsun, Ordu, Giresun, Trabzon ve Rize illerinden doğal yolla avlanan istavrit, barbunya, mezigit, zargana, hamsi, levrek, alabalık ve kefal balıklarından toplamda 1265 adet balık örneği toplandı. Toplanan balık örneklerinden her bir havuzda 5 balık örneği olacak şekilde gruplandı. Balıkların, virusun tropizmi olduğu bilinen, beyin ve göz dokularından homojenatlar hazırlandı. Toplanan balıklardan elde edilen doku örnekleri real-time reverse transcriptase PCR (rtRT-PCR) metodu ile viral nükleik asit yönünden araştırıldı. Yapılan moleküler tarama sonucunda örneklenen balık türlerinden Samsun ilinden alınan barbunya balık türü havuzlarından bir örnek VNNV nükleik asit yönünden pozitif bulundu. Yapılan sekans analizi sonucunda bulunan virusun Akdeniz’de endemik olan RGNNV genotipine ait olduğu belirlenmiştir. Bu tez çalışması sonucunda Türkiye’de yabani hayatta ilk kez Betanodavirus tespiti yapılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Balık, Barbunya, Betanodavirus, Karadeniz, Rt-pcr, Vnnv

ABSTRACT

EPIDEMIOLOGY OF BETANODAVIRUS INFECTION IN CAPTURED FISH IN BLACKSEA

Bahadır MÜFTÜOĞLU
Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies
Department of Veterinary Virology
Ph.D., February/2023
Supervisor: Prof. Dr. Harun ALBAYRAK

Viral Nervous Necrosis (VNN) is an important viral disease causes great losses with epidemics in the world. There is no VNN study on wildlife in the Black Sea in Turkey. For this reason; This study was conducted for VNN viral nucleic acid in 8 fish species naturally caught in 6 provinces in the Central and Eastern Black Sea Region. A total of 1265 fish samples were collected from naturally caught horse mackerel, red mullet, haddock, garfish, anchovy, sea bass, trout and mullet from the provinces of Sinop, Samsun, Ordu, Giresun, Trabzon and Rize. The collected fish samples were grouped as 5 fish samples in each pool. Suspensions were prepared from brain and eye tissues of fish, known to have tropism of the virus. Tissue samples obtained from the collected fish were investigated for viral nucleic acid by real-time reverse transcriptase PCR (rtRT-PCR) method. As a result of the molecular scanning, one sample from the red mullet fish species pools from Samsun province was found positive for VNNV nucleic acid. As a result of the sequence analysis, it was determined that the virus found belongs to the RGNNV genotype, which is endemic in the Mediterranean. As a result of this thesis, Betanodavirus was detected for the first time in wild life in Turkey.

Keywords: Fish, Red Mullet, Betanodavirus, Blacksea, Rt-pcr, Vnnv

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Bilgi ve desteğiyle doktora eğitimimi tamamlamamı sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Harun ALBAYRAK'a, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veterinerlik Virolojisi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA'ya, Sayın Prof. Dr. Zafer YAZICI'ya, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Cüneyt TAMER'e, Veterinerlik Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Emre ÖZAN'a, laboratuvar çalışmalarında emeği geçen Araş. Gör. Hannenur KURUÇAY'a, Araş. Gör. Seda GÖZEL'e, Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Viroloji laboratuvarında görev yapan Dr. Hamza KADI'ya, örnek toplama ve işleminde büyük emeği geçen Fatih DOĞAN'a, Serdar YILDIRIM'a, Hakan TÜTÜNCÜ'ye, Muhammet ÖVECEK'e, İzmir Veteriner Kontrol Enstitüsü Viroloji laboratuvarında görev yapan Dr. Murat KAPLAN'a teşekkür ederim. Tez sürecinde her zaman beni destekleyen ve yanımda olan sevgili eşim Büşra YALÇIN MÜFTÜOĞLU'na, bugünlere gelmeme vesile olan annem Gülhan MÜFTÜOĞLU ve babam Nurettin MÜFTÜOĞLU'na ve canım kardeşim Beyza MÜFTÜOĞLU'na ayrıca sevgilerimi sunarım.

Bu çalışma, PYO.VET.1904.20.005 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

Bahadır MÜFTÜOĞLU

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Viral Nervöz Nekrozis	3
2.1.1. Tanım	3
2.1.2. Tarihçe.....	3
2.1.3. Etiyoloji	4
2.1.4. Viral Replikasyon	6
2.1.5. Epidemiyoloji.....	7
2.1.6. VNNV Enfeksiyonunun Türkiye’deki Durumu	9
2.1.7. Bulaşma	10
2.1.8. Patogenez ve Klinik Bulgular	10
2.1.9. Teşhis	11
2.1.10. Koruma ve Kontrol	14
2.2. Amaç	17
3. MATERYAL VE METOD.....	18
3.1. Materyal	18
3.1.1. Balık Örnekleme.....	18
3.1.2. Hücre Kültürü	19
3.1.3. RNA Ekstraksiyonu, RT-PCR, rRT PCR Kitleri, Primerler ve Prob	19
3.1.4. Dizi Analizi ve Kullanılan Primerler.....	20
3.1.5. Plazmid Klonlama	21
3.2. Metod	21
3.2.1. Homojenatların Hazırlanması	21
3.2.2. RNA Ekstraksiyonu.....	24
3.2.3. Real Time RT-PCR.....	25
3.2.4. Konvansiyonel RT-PCR.....	25
3.2.5. PCR ürününün Plazmide Klonlanması	27
3.2.6. Plazmidin <i>E.coli</i> Hücrelerine Transformasyonu.....	27
3.2.7. Plazmidin Saflaştırılması ve Doğrulanması.....	27
3.2.8. Genom Dizileme ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması.....	28
3.2.9. Hücre Kültürü ve Virus İzolasyonu.....	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. Nekropsi Bulguları.....	30
4.2. Real Time RT-PCR Sonuçları	30
4.3. Konvansiyonel PCR Sonuçları	30
4.4. Plazmid Klonlama Sonuçları	31
4.5. Genom Dizileme ve Filogenetik Analiz Sonuçları	33
4.6. Virus İzolasyonu.....	38
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	44
EKLER.....	55
Ek 1. VNNV.TR.Samsun.01 RNA1 (Genbank No: OP933715)	55
Ek 2. VNNV.TR.Samsun.01 RNA2 (Genbank No: OP933716)	56

Ek 3. RNA1 Filogenetik Ağacı Oluşturulurken Kullanılan Sekans Bilgileri	57
Ek 4. RNA2 Filogenetik Ağacı Oluşturulurken Kullanılan Sekans Bilgileri	59
ÖZ GEÇMİŞ	61



SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Adenin
aa	: Amino asit
bç	: Baz çifti
BFNNV	: Barfin Flounder Nervous Necrosis Virus
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
C	: Sitozin
cm	: Santimetre
CP	: Kapsid Proteini
CPE	: Sitopatik etki
E-11	: SSN-1 klonu hücre hattı
F	: Forward
FBS	: Fötal Bovine Serum
G	: Guanin
GF-1	: Goldfish Fin Hücre Hattı
ICTV	: Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi
IFAT	: Immunfloresan Antikor Testi
LAMP	: Loop-Mediated Isothermal Amplification
L-15	: Leibovitz's Medium
NCBI	: National Central for Biotechnology Information
NNV	: Nervöz Nekrozis Virus
nt	: Nükleotid
WOAH	: Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
ORF	: Açık Okuma Bölgesi
pH	: Power of Hydrogen
R	: Reverse
RdRp	: Viral RNA'ya bağlı RNA polimeraz
RGNNV	: Redspotted Grouper Nervous Necrosis Virus
Rt RT-PCR	: Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RNA	: Ribo Nükleik asit
RPS	: Relative Percentage Survival (rölatif hayatta kalma oranı)
SJNNV	: Striped Jack Nervous Necrosis Virus

SSN-1	: Striped Snakehead Fish Fry
T	: Timin
TNV	: Turbot Nervöz Nekrozis Virus
TPNNV	: Tiger Puffer Nervous Necrosis Virus
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UTR	: Untranslated Region
UV	: Ultraviyole
VER	: Viral Ensefalopati ve Retinopati
VNNV	: Viral Nervöz Nekrozis Virus



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. FAO 1950-2020 yılları arası dünya su ürünleri üretim miktarı.....	1
Şekil 1.2. TÜİK 2000-2021 yılları arası Türkiye su ürünleri üretimi	2
Şekil 2.1. Nodavirus genom şeması	4
Şekil 2.2. Betanodavirus replikasyon siklusu şeması.....	7
Şekil 2.3. VNN virusu genotiplerinin coğrafi dağılımları	8
Şekil 3.1. Balık örneklerinin toplandığı iller	18
Şekil 3.2. Balık ağırlık ölçümleri.....	22
Şekil 3.3. Balık uzunluk ölçümleri.....	23
Şekil 3.4. Balıklardan göz ve beyin dokularının alınması.	23
Şekil 3.5. Balık homojenatlarından RNA ekstraksiyonu.....	24
Şekil 3.6. Virus inokulasyonuna hazır SSN-1(a) ve E-11(b) hücre kültürünün ters mikroskop görüntüsü	29
Şekil 4.1. rtRT-PCR sonucu pozitif olarak tespit edilen örnek görüntüsü	30
Şekil 4.2. Samsun Barbunya örneğinin 1357 baz çifti (bç) uzunluğundaki RNA1 bant görüntüsü.	31
Şekil 4.3. Samsun Barbunya örneğinin 349 baz çifti (bç) uzunluğundaki RNA2 bant görüntüsü	31
Şekil 4.4. Transformasyon işlemi sonrası sıvı besi yerinden LB agara aktarılan ve inkübe edilen <i>E.coli</i> JM109 kolonileri.....	32
Şekil 4.5. LB agardan alınan ve sıvı besiyerinde inkübe edilen kolonilerin oluşturduğu bulanık görüntü	33
Şekil 4.6. Seçilen dört koloniden pürifiye edildikten sonra kesim enzimiyle kesilerek agar jelde yürütülen plazmidin ve örnek RNA'sının jel görüntüsü	33
Şekil 4.7. Elde edilen pozitif örneğin 1216 bç uzunluğundaki RNA1 kısmi sekansı ve genbank veri ile oluşturulan filogenetik ağaç..	35
Şekil 4.8. Elde edilen pozitif örneğin 930 bç uzunluğundaki RNA2 kısmi sekansı ve genbank veri ile oluşturulan filogenetik ağaç..	36
Şekil 4.9. Tez örneği ve referans verilerin RNA2 segmentinin kodladığı kapsid proteininin 256. aa pozisyonundaki valin-izolöysin değişikliği.	37
Şekil 4.10. Virus inokulasyonu öncesi E-11 hücre hattı (A) ve inokulasyondan 9 gün sonra E-11 hücre hattının (B) ters mikroskop görüntüsü	38

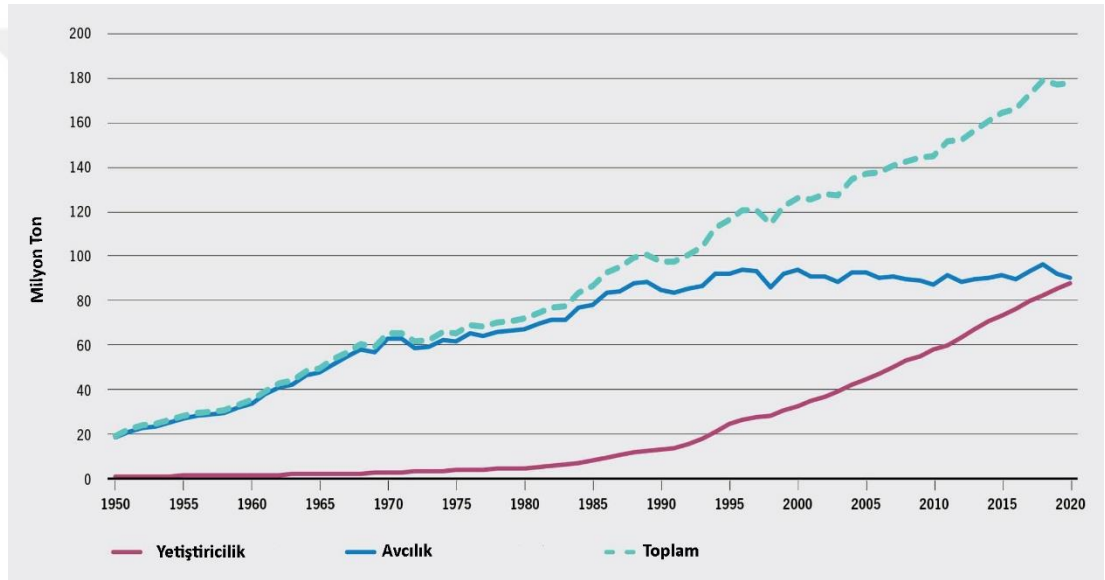
TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. VNNV genotipleri, serotipleri, optimum gelişme sıcaklıkları	8
Tablo 2.2. WOAHA'nın önerdiği test metodları ve kullanılabilirlikleri.....	14
Tablo 3.1. Örneklenen balık türleri ve şehirler	19
Tablo 3.2. Örneklenen balık türlerinin ortalama boy (cm) ve ağırlıkları (gr)	19
Tablo 3.3. Teşhiste kullanılan primer-prob bilgileri	20
Tablo 3.4. Kullanılan primer-prob bilgileri	21
Tablo 3.5. rt RT-PCR Master Mix içeriği	25
Tablo 3.6. RT-PCR Master Mix içeriği.....	26



1. GİRİŞ

Balıkçılık ve su ürünleri üretim sektörü son yıllarda artan nüfusla birlikte gelen özellikle protein açısından zengin gıda ihtiyacından dolayı 21. yüzyılda dikkat çeken gıda üretim sektörlerinden biri haline gelmiştir. Avcılık ve üretim olmak üzere iki şekilde yapılan balıkçılık sektörü de tüketimin ve hayvansal protein ihtiyacının artmasından dolayı yıldan yıla artan bir grafikte karşımıza çıkmaktadır. 2019 yılında belirtilen rapora göre dünyada tüketilen hayvansal proteinlerin %17'sini su ürünleri oluşturmaktadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) raporuna göre de gıda sektörleri arasında son 10 yılda en fazla gelişim gösteren sektörün su ürünleri sektörü olduğu bildirilmiştir (FAO, 2022).



Şekil 1.1. FAO 1950-2020 yılları arası dünya su ürünleri üretim miktarı (FAO, 2021)

Türkiye’de de balıkçılık sektörü dünyada olduğu gibi her geçen yıl artış göstermektedir. Farklı özelliklere sahip 3 denize, 8333 km uzunluğundaki kıyı şeridine sahip ülkemiz baraj, göl ve akarsularıyla önemli iç su ve deniz balıkçılığı üretim gücüne sahiptir (Arslan ve Yıldız, 2021). Uzun yıllardır avcılık temelli olan üretim son yıllarda, yetiştiriciliğin ilerleyen teknolojiyle birlikte artmasıyla yetiştiriciliğe yönelmiştir. Türkiye’de ve dünyada avcılık son yıllarda yetiştiriciliğe göre daha az gelişim gösterse de su ürünleri üretimindeki önemini korumaktadır. Türkiye’de avcılığı yapılan balıklar başta hamsi olmak üzere (151.598 ton), istavrit (24.006 ton), sardayla (15.800 ton), mezgit (10.380 ton) balıklarıdır.

Yıllar	AVCILIK (ton)			YETİŞTİRİCİLİK (ton)			TOPLAM (ton)
	Deniz	İçsu	Toplam	Deniz	İçsu	Toplam	
2000	460.521	42.824	503.345	35.646	43.385	79.031	582.376
2001	484.410	43.323	527.733	29.730	37.514	67.244	594.977
2002	522.744	43.938	566.682	26.868	34.297	61.165	627.847
2003	463.074	44.698	507.772	39.726	40.217	79.943	587.715
2004	504.897	45.585	550.482	49.895	44.115	94.010	644.492
2005	380.381	46.115	426.496	69.673	48.604	118.277	544.773
2006	488.966	44.082	533.048	72.249	56.694	128.943	661.991
2007	589.129	43.321	632.450	80.840	59.033	139.873	772.323
2008	453.113	41.011	494.124	85.629	66.557	152.186	646.310
2009	425.046	39.187	464.233	82.481	76.248	158.729	622.962
2010	445.680	40.259	485.939	88.573	78.568	167.141	653.080
2011	477.658	37.097	514.755	88.344	100.446	188.790	703.545
2012	396.322	36.120	432.442	100.853	111.557	212.410	644.852
2013	339.047	35.074	374.121	110.375	123.019	233.394	607.515
2014	266.078	36.134	302.212	126.894	108.239	235.133	537.345
2015	397.731	34.176	431.907	138.879	101.455	240.334	672.241
2016	301.464	33.856	335.320	151.794	101.601	253.395	588.715
2017	322.173	32.145	354.318	172.492	104.010	276.502	630.820
2018	283.955	30.139	314.094	209.370	105.167	314.537	628.631
2019	431.572	31.596	463.168	256.930	116.426	373.356	836.524
2020	331.281	33.119	364.400	293.175	128.236	421.411	785.811
2021	295.018	33.140	328.158	335.644	136.042	471.686	799.844

Şekil 1.2. TÜİK 2000-2021 yılları arası Türkiye su ürünleri üretimi (TÜİK, 2021)

Türkiye’de ve dünyada su ürünleri üretiminde bulaşıcı enfeksiyöz ajanlar önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Diğer tarım ve hayvancılık sektörleri içerisinde kontrol edilmesi en zor ortam olan su ortamında bulunan bu ajanlardan arılık ve korunma büyük önem taşımaktadır. Larvalarda % 100’e varan ölüm oranlarıyla ve 50’den fazla balık türünü etkilemesiyle Viral Nervöz Nekrozis Virusu (VNNV) özellikle son on yılda tüm dünyada dikkat çeken önemli viral patojenlerden biri olmuştur. Bu tez çalışmasında Karadeniz’de avcılığı yapılan balıklarda VNN virusunun varlığı araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Viral Nervöz Nekrozis

2.1.1. Tanım

Viral nervöz nekrozis virus (VNNV), *Nodaviridae* ailesinde, *Betanodavirus* genusu içerisinde sınıflandırılan, dünya çapında ilk tespit edildiği 1985'ten günümüze, Güney ve Doğu Asya, Çin, Hindistan, İran, Japonya, Kore, Filipinler, Tayland, Malezya, Vietnam, Endonezya, Okyanusya (Tahiti, Avustralya), Akdeniz ülkeleri (Fransa, Portekiz, İtalya, Malta, İsrail, Tunus, Yunanistan, İspanya), İngiltere, Norveç, Karayipler, Kuzey Amerika ve Kanada'da bilinen tuzlu ve tatlı suda yaşayan 120'den fazla balık ve omurgasız türünde enfeksiyon oluşturan, küresel su ürünlerini tehdit eden ölümcül bir virustur (Costa and Thompson, 2016; WOA, 2019). 50'den fazla balık türünü etkileyen virus, sıcaklık ve fizyolojik özelliklere göre değişmekle birlikte özellikle larva ve juvenil evresindeki balıklarda %100'e varan mortalite oranıyla balık üretimi için büyük bir tehdit oluşturmaktadır (Li et al., 2020).

2.1.2. Tarihçe

Nodavirus (NoV), ismini ilk olarak 1956'da Japonya'da bulunan Nodamura köyünde sivrisinek (*C. tritaeniorhynchus* ve *C. pipiens*) süspansiyonundan elde edilen daha önce sınıflandırılmamış olan yeni bir arbovirusla almıştır (Scherer and Hurlbut, 1967).

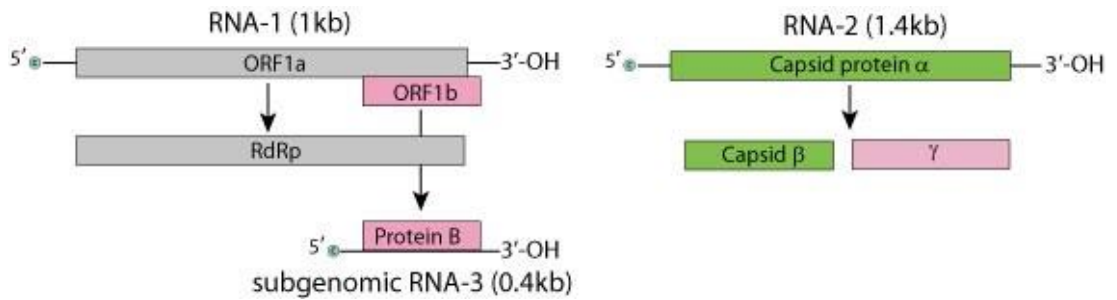
VNN, balıklarda 1985 yılında dikkat çeken Nagasaki'deki papağan balıklarında (*Oplegnathus fasciatus*) büyük kayıplarla ilk kez salgın bir hastalık tablosu oluşturmuştur (Yoshikoshi and Inoue, 1990). Daha sonra benzer semptomlar gösteren bir salgın Avustralya, Malezya ve Tayland'da asya levreğinde bildirilmiştir (Munday et al., 1992). Balıklarda sinir sisteminde vakuol oluşumu ve ensefalopati semptomlarından dolayı bu virüsü önce 'picorna benzeri virus' olarak tanımlamışlardır (Glazebrook et al., 1990). Virus ilk kez striped jack (*Pseudocaranx dentex*)'ten saflaştırılmıştır. Bundan dolayı Striped Jack Nervöz Nekrozis Virus (SJNNV) olarak isimlendirilmiştir. Virus virion yapısı, büyüklüğü ve genom özellikleri doğrultusunda *Nodaviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılmıştır (Mori K et al., 1992; Murphy et al., 1995). Virusun ilk izolasyonu enfekte levreklerden (*Dicentrarchus labrax*) alınan örneklerden SSN-1 hücre hattında yapılmıştır (Frerichs et al., 1996). Ancak virus daha sonra salgın sırasında asya levreği (*Lates calcarifer*) ve avrupa levreğinden de (*Dicentrarchus labrax*) teşhis edilmiştir (Comps et al., 1994). Hastalık, Viral

Ensefalopati ve Retinopati (VER) (Munday et al., 1992), VNN (Yoshikoshi and Inoue, 1990), levrek ensefalopatisi (Bellance and Gallet de Saint-Aurin, 1988), kalkan ensefalomiyelitisi (Bloch. et al., 1991), balık ensefalopatisi (Comps and Raymond, 1996) gibi isimler almıştır ve günümüzde VNN ve VER olarak isimlendirilmektedir (Munday et al., 2002).

2.1.3. Etiyoloji

Nodaviridae ailesi *Alfanodavirus* ve *Betanodavirus* olarak iki cinse ayrılmaktadır (Ball et al., 1994). *Alfanodavirus* cinsi genel olarak insektleri, *Betanodavirus* cinsi ise balıkları enfekte eden nodavirusları içermektedir. VNN virusu *Nodaviridae* ailesi içinde *Betanodavirus* cinsinde yer alan ikosahedral simetrik 25 nm çapında zarfsız bir RNA virusudur (Mori K et al., 1992). 180 eş kapsomer T=3 ikosahedral simetrik şekilde birleşerek virus kapsidini oluşturmaktadır (Schneemann et al., 1998).

Pozitif polariteli tek iplikçikli (ssRNA) iki segmentten oluşan viral genomun, RNA1 segmenti 3.1 kb uzunluğunda, 110 kDa büyüklüğünde RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp – Protein A) proteinini kodlamakta (Mori K et al., 1992), RNA2 segmenti 1.4 kb uzunluğunda, 42 kDa büyüklüğünde kapsid proteinini kodlamaktadır (Nishizawa et al., 1995b). Ayrıca virus replikasyonu sırasında RNA1 segmentinin 3' ucundan ayrılan 0.4 kb uzunluğunda bir subgenomik RNA3 sekansı, yapısal olmayan B1 ve B2 proteinini kodlar (Iwamoto et al., 2005). Segmentlerin 3' uçlarında poly (A) bulunmaz (NishizawaT. et al., 1994; Iwamoto et al., 2005).



Şekil 2.1. Nodavirus genom şeması (Anonim 2022a). Kapsid proteini (Protein α Alfanodavirusta β ve γ olarak ayrılmaktadır. Bu ayrım Betanodavirusta yoktur.)

RNA1'in uzunluğu ve kodladığı protein konakçı türüne bağlıdır. RNA1 segmenti, Striped Jack Nervöz Nekrozis Virus'ta (SJNNV) 3107 nt, Red-spotted

Grouper Nervöz Nekrozis Virus'ta (RGNNV) 3103-3105 nt, Barfin Flounder Nervöz Nekrozis Virus'ta (BFNNV) 3100-3101 nt, Tiger Puffer Nervöz Nekrozis Virus (TPNNV) genotipinde 3112 nt uzunluğundadır. Protein A, SJNNV'de 983 aa, RGNNV'de 982 aa, BFNNV'de 981 aa, TPNNV ise 982 aa uzunluğundadır (Nagai and Nishizawa, 1999; Tan et al., 2001; Sommerset and Nerland, 2004). RNA2 segmenti kapsid proteini SJNNV'de 340 aa, diğer genotiplerde 338 aa uzunluğundadır (Delsert et al., 1997; Tan et al., 2001; Hegde et al., 2003).

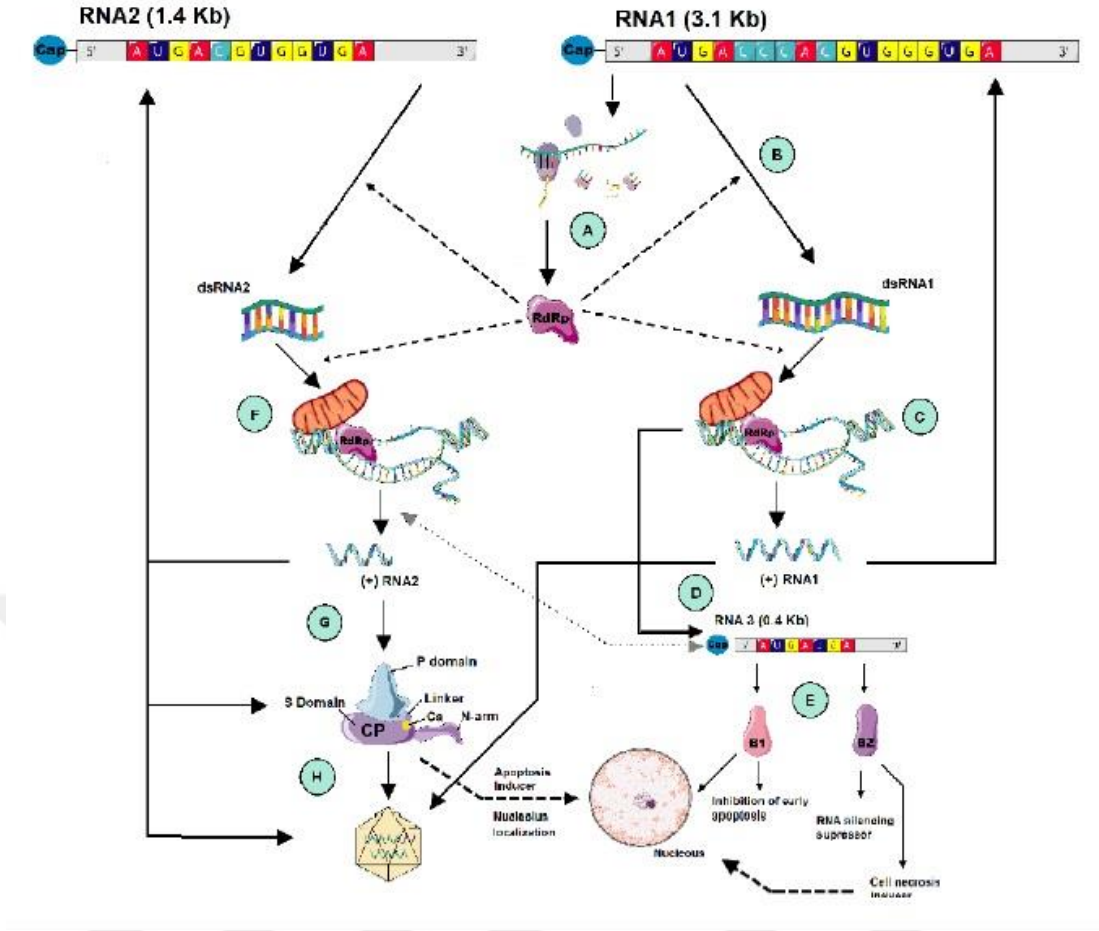
RNA2 segmenti, konakçı spesifitesinde rol almaktadır ve segmentin T4 değişken bölgesine göre yapılan sınıflandırmada VNN; Striped Jack Nervous Necrosis Virus (SJNNV), Tiger Puffer Nervous Necrosis virus (TPNNV), Red-spotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV) ve Barfin Flounder Nervous Necrosis Virus (BFNNV) olmak üzere dört genotipe ayrılmıştır (Nishizawa et al., 1995b; Panzarin et al., 2016). Ayrıca kalkan balığından (*Scophthalmus maximus*) izole edilmiş yeni bir genotip olarak turbot nervous necrosis virus (TNNV) önerilmiştir ancak henüz resmi sınıflandırmada yer almamaktadır (Johansen et al., 2004). VNNV'nin sınıflandırıldığı dört genotip, poliklonal antikorlar kullanılarak yapılan nötralizasyon testleriyle üç ana serotipe ayrılmıştır. Buna göre; SJNNV ve RGNNV/SJNNV genotipi serotip A, TPNNV genotipi serotip B ve BFNNV, RGNNV ve SJNNV/RGNNV genotipleri serotip C içerisinde sınıflandırılmıştır (Nishizawa et al., 1997; Mori et al., 2003; Iwamoto et al., 2004; Panzarin et al., 2016). Buna karşın Panzarin vd. (2016) ve özellikle Mori vd. (2003), yaptığı sınıflandırmalarda Asya izolatlarının çoğunlukta olduğunu, soğuk su viruslarının ve segment değişikliklerinin gözardı edildiğini savunmuştur. Akdeniz izolatları ve segment değiştirmiş viruslarla yaptıkları çalışmada BFNNV'nin B serotipi içinde değerlendirilmesi gerektiğini bildirmiştir (Panzarin et al., 2016). Ayrıca genotipler arasında çapraz reaksiyon olmadığı bilinse de Panzarin ve ark. (2016) RGNNV, SJNNV/RGNNV, TPNNV ve BFNNV genotipleri arasında az miktarda çapraz reaksiyon olabileceğini bildirmiştir.

VNNV segmentli bir virus olmasından dolayı segment değişimleri (reassortment) gerçekleşebilmektedir ve bu değişimin konakçı spesifitesinde ve patojenitede değişiklik yaptığı bildirilmiştir. Reassortant viruslar adlandırılmalarını segmentlerinin ait olduğu (RNA1/RNA2) genotipe göre almaktadır. Dört genotip olmasına rağmen şu ana kadar RGNNV/SJNNV ve SJNNV/RGNNV olmak üzere iki genotip arasında reassortant virus tespit edilmiştir. İki reassortantın da bulunmasına

rağmen RGNNV/SJNNV' nin daha yaygın olduğu bildirilmiştir. (Panzarin et al., 2012; Bitchava et al., 2019).

2.1.4. Viral Replikasyon

Betanodavirus replikasyon siklusu hakkında geniş çaplı bir bilgi henüz bulunmamaktadır. Virusun konakçı hücredeki N-glikolize siyalik asit reseptörlerine bağlandığı düşünülmektedir (Low et al., 2017). Virus konakçı hücreye pinositoz yoluyla girer. Örtücü katmanlardan ayrılarak, viral genomu hücre stoplazmasına bırakır (Venter and Schneemann, 2008). Pozitif anlamlı olan RNA1 segmentinin translasyonu ile Protein A (RdRp) proteini sentezlenir. Protein A'nın 223. aa pozisyonunun sıcaklık toleransında rol aldığı bildirilmiştir (Souto et al., 2019). RdRp replikasyon kompleksi, erken replikasyon döneminde konakçı dış mitokondriyal membranlarına yerleşir (Chen et al., 2006). RdRp viral RNA1'i tamamlayarak çift iplikçikli RNA sentezler. Bu RNA kalıbı kullanılarak yeni RNA zincirleri oluşturulur. Bu işlemler mitokondrinin dış membranında gerçekleşir. Daha sonra RNA1'in 3'ucundan sub-genomik RNA, RNA3 transkribe edilir ve bu RNA3'ten B1 ve B2 proteini sentezlenir. B1 proteininin erken dönem apoptoz inhibitörü olarak rol aldığı, B2 proteininin hücrel RNA sessizleşmesinin inhibitörü olarak görev aldığı ve RNA2 transkripsiyonunu regüle ettiği düşünülmektedir. Daha sonra RNA2'den kapsid proteini sentezlenir ve pozitif anlamlı RNA1-RNA2 segmentleri hücre sitoplazmasında paketlenir (Iwamoto et al., 2005; Chen et al., 2009; I Bandín and S Souto, 2020)



Şekil 2.2. Betanodavirus replikasyon siklusu şeması (SMART Servier Medical Art, 2020)

Betanodavirus replikasyon çalışmaları RNA1'in erken replikasyon döneminde, viral replikasyon komplekslerinin oluştuğu yeterli bir seviyeye kadar daha çok eksprese edildiği, RNA2'nin geç replikasyon döneminde, yeterli virion paketlenmesi yapılacak kapsid proteini üretilene kadar daha çok eksprese edildiğini bildirmiştir (Kim et al., 2019). Geç replikasyon döneminde kapsid proteini nükleusta birikir ve RdRp kompleksi konakçı endoplazmik retikulumuna geçiş yapar. Bu mekanizmanın hücre apoptozunu indüklediği ve hücre ölümünü başlattığı düşünülmektedir. Hücre lize olur, yeni virionlar ortama saçılır ve hücre lizisi, vakuol oluşumu olarak görülür (Guo et al., 2003).

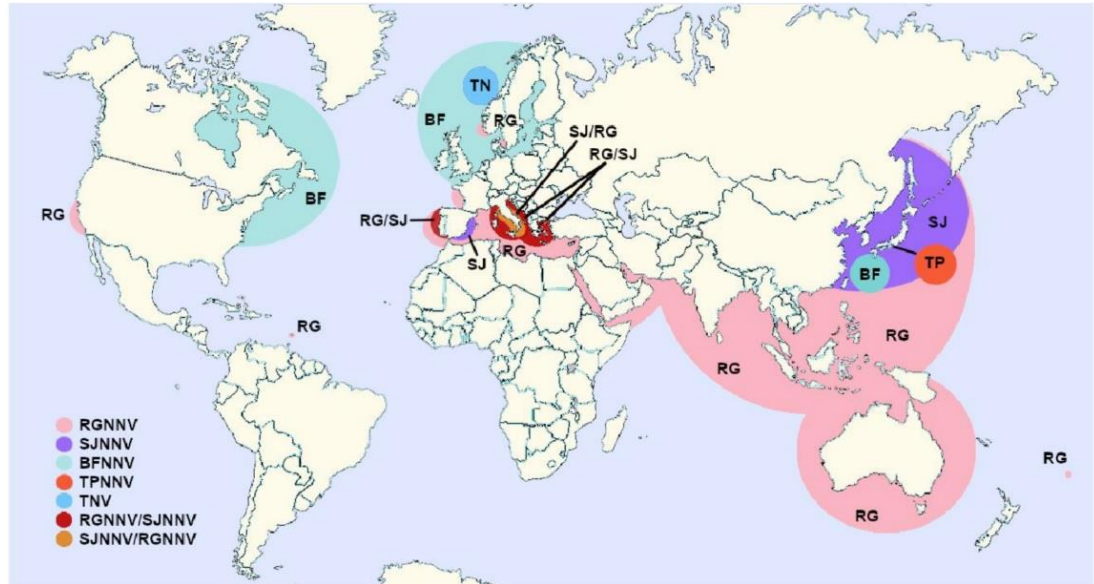
2.1.5. Epidemiyoloji

Su ortamındaki viral enfeksiyonlarda su sıcaklığı, virusun enfeksiyözite gücünü ve konakçının virusa karşı direncini belirleyen en önemli faktörlerdendir. VNN virusunda da virusun varlığını sürdürebilmesi ve patojenite gücünü koruyabilmesi için her genotipinin etkili olduğu farklı optimum su sıcaklığı vardır. Bu sıcaklık aralıkları;

BFNNV için 15–20 °C, TPNNV için 20 °C, SJNNV için 20–25 °C ve RGNNV genotipi için 25–30 °C olarak bildirilmiştir (Iwamoto et al., 2000). RGNNV genotipinin 15-35 °C ile en geniş sıcaklık toleransına sahip olduğu gösterilmiştir (Ciulli et al., 2006; Hata et al., 2007). Yapılan çalışmalar VNN virusunun RNA1 segmentinin özellikle 1-445 aa aralığının, genotiplerin sıcaklık hassasiyetinde önemli rol oynadığı yönündedir (Hata et al., 2010; Panzarin et al., 2014).

Tablo 2.1. VNNV genotipleri, serotipleri, optimum gelişme sıcaklıkları (Nishizawa et al., 1997; Iwamoto et al., 2000; Munday et al., 2002; Chi et al., 2003; Chen et al., 2014)

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



Şekil 2.3. VNN virusu genotiplerinin coğrafi dağılımları (SMART Servier Medical Art, 2020)

Virus Güney Amerika hariç bütün dünyadan bildirimi yapılmıştır (Shetty et al., 2012). VNN'in sıcaklık hassasiyeti ve konakçı spektrumu, virusun coğrafik

dağılımıyla bağlantılıdır. TPNNV genotipi, Japonya’da sadece tiger puffer (*Takifugu rubripes*) dan izole edilmiştir ve yaygın değildir (Nakai et al., 1994). TNNV bir kez Norveç’te kalkan balığında (*Scophthalmus maximus*) bildirilmiştir (Johansen et al., 2004). BFNNV genotipi, soğuk su bölgelerinde özellikle levrek (*Dicentrarchus labrax*), pasifik morinası (*Gadus macrocephalus*), atlantik morinası (*Gadus morhua*), barfin pisi balığından (*Verasper moseri*) Avrupa’nın ve Amerika’nın kuzey bölgeleri ve İskandinav ülkeleri, Japonya, Kanada, Kuzey Amerika, Norveç, İngiltere’de izole edilmiştir (I Bandín and S Souto, 2020). SJNNV genotipi sadece Japonya’da çiftlik balıklarında (kral balığı *Pseudocaranx dentex*, kırmızı çipura *Pagrus major*) olduğu düşünülmekteydi ancak İspanya İber Yarımada’sında çiftliklerde çipura (*Sparus aurata*), kaya levreği (*Argyrosomus regius*) ve yassı bir balık olan *Solea senegalensis*’te de bildirilmiştir (Cutrín et al., 2007; Lopez-Jimena et al., 2010). Diğer genotiplerin aksine RGNNV genotipi, en geniş konakçı spektrumuna ve coğrafi dağılıma sahiptir. Başta Akdeniz olmak üzere Avusturalya ve Asya kıyıları ve ABD’de özellikle levrek ve orfoz, barramundi gibi birçok balıkta enfeksiyon oluşturmaktadır (Ciulli et al., 2007; Moody et al., 2009; Binesh, 2013a; Haddad-Boubaker et al., 2013; Kara et al., 2014). Reassortant genotiplerden SJNNV/RGNNV sadece İtalya ve Hırvatistan kıyısında levreklerden izole edilirken, RGNNV/SJNNV Güney Avrupa kıyılarında sole (*Solea senegalensis*, *Solea solea*), levrek, çipuralarda görülmektedir (Toffolo et al., 2007; Olveira et al., 2009; Panzarin et al., 2012).

2.1.6. VNNV Enfeksiyonunun Türkiye’deki Durumu

VNN enfeksiyonu Türkiye’de ilk kez 2011 yılında Mersin ilinden alınan levreklerden tespit edilmiştir. Virusun identifikasyonu SSN-1 hücre kültüründe izolasyonu yapıldıktan sonra IFAT ve RT-PCR testi ile yapılmıştır. Örnek daha sonra WOAHA referans laboratuvarı (Zooprofilattico Istituto Sperimentale delle Venezie) ile onaylanmıştır (Özyer vd., 2014). 2016 yılında yürütülen bir çalışmada, Karadeniz’de çiftlikten alınan levreklerden RGNNV genotipi VNNV tespiti yapılmıştır (Kaplan vd., 2021). Kaplan ve Karaoğlu (2021) 2016-2017 yıllarında Türkiye’deki levrek çiftliklerinden aldıkları örneklerden VNNV teşhis ederek virusun RGNNV genotipine ait olduğunu bildirmişlerdir. Türkiye’de ilk reassortant virus tespiti, 2019 yılında Ege Denizi’ndeki çiftliklerden alınan çipuralardan yapılmış ve virus RGNNV/SJNNV reassortant virusu bulunmuştur (Kaplan vd., 2022).

2.1.7. Bulaşma

Virusun bulaşmasında horizontal ve vertikal yolla bulaşma, birçok çalışmada farklı balık türlerinde gösterilmiştir. Horizontal yolla enfekte balıklarla birlikte yaşayan balıklara bulaşmada özellikle suyun rol oynadığı, suda aktif viral partikül bulunmasıyla da kanıtlanmıştır (Arimoto et al., 1994; Le Breton et al., 1997; Curtis et al., 2001; Hick et al., 2011). Ayrıca balık üretim çiftliklerinde kullanılan ekipmanlarla da virus saçılmaktadır (Mori et al., 1998).

Enfeksiyonun vahşi ve kültür balıklarında uzun süre persiste kaldığı ve virusu saçtığı gösterilmiştir (Munday et al., 2002; Oliveira et al., 2013; Ma et al., 2015). Çipura (*Sparus aurata*) ve kurt balığında (*Anarhichas minor*) yapılan deneysel enfeksiyonlarda, klinik semptom göstermemesine rağmen sırasıyla üç ay ve dört ay sonra da balıklardan virus tespiti yapılmıştır (Johansen et al., 2003; López-Muñoz et al., 2012).

Balıklar dışındaki bazı omurgasız canlılar da virus için rezervuar konakçı olarak bulaşmada önemli rol oynayabilmektedir (Gomez et al., 2010). *Nadidae* ailesine ait kum solucanları (Liu et al., 2006), yengeç, midye, istakoz (Gomez et al., 2008) ve larva beslemede kullanılan karides ve bazı midyelerde VNN virusu tespit edilmiştir (Frerichs et al., 2000; Costa and Thompson, 2016).

Vertikal bulaşma her türde olmasa da virus, enfekte kral balığı (Nguyen et al., 1997), pisi balığı (*Verasper moseri*) (Yoshimizu, 1997), Avrupa ve Asya levreği (Breuil et al., 2002; Azad et al., 2006), atlantik tütün balıklarının (Grotmol et al., 1999) gonadlarında, yumurtalarda ve larvalarda, genital sıvılarında tespit edilmiştir.

2.1.8. Patogenez ve Klinik Bulgular

VNNV'nin patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışma sonuçları türlerde ve balık özelinde değişiklik göstermektedir. Ancak ulaşılan sonuçlara göre hipotezler oluşturularak çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. VNNV'nin giriş yolları olarak çeşitli çalışmalarda deri (Souto et al., 2018), solungaçlar (Grotmol et al., 1997), oral ve nazal boşluk gösterilmiştir (S. Tanaka et al., 2004). Virus organizmaya girerek periferik sinirlerde replike olduktan sonra, sinir yolları boyunca merkezi sinir sistemine (MSS), beyne ve retinaya ulaşarak bu bölgelerde patoloji oluşturmaktadır (Souto et al., 2018). Bazı araştırmacılara göre virus nazal epitele penetre olarak olfaktör bulbus, beyin, medulla oblongata, omurilik ve son olarak retina yayılmaktadır (Mladineo, 2003; S Tanaka et al., 2004). Virusun daha sonra nörolojik

olmayan dokularda da bulunması, (solungaçlar, yüzgeçler, kalp, barsak, mide, dalak, karaciğer, böbrek ve gonadlar) etkenin viremi yoluyla da yayılabileceğini göstermiştir (Nguyen et al., 1997; Mladineo, 2003; Korsnes et al., 2009; Mazelet et al., 2011).

İnkübasyon periyodunun su sıcaklığı, genotip ve konakçı türüne bağlı olduğu gösterilmiştir (Souto et al., 2018). Su sıcaklığı arttıkça inkübasyon periyodu kısalmakta ve enfeksiyonun şiddeti artmaktadır. (Tanaka et al., 1998). İntra musküler enjeksiyon yapılan Avrupa levreği ve daldırma yöntemiyle enfekte edilen Asya levreği larvalarında 2 gün sonra klinik bulgular tespit edilmiştir (Peducasse et al., 1999; Parameswaran et al., 2008). Yetişkin balıklarda bu süre 5-10 güne çıkmaktadır (Vendramin et al., 2014; Toffan et al., 2016).

Histopatolojik VNN bulguları arasında belirgin olarak MSS'de, beynin orta ve arka bölümünde ve retinada yaygın vakuolizasyondur. Elektron mikroskobu ile enfekte sinir hücrelerinin sitoplazmasında virus partikülleri görülebilir (Glazebrook et al., 1990; Nishizawa et al., 1995a). Lezyonların balık yaşıyla bağlantılı olduğu görülmüştür. Larvalarda beyin lezyonları daha şiddetli görülürken, juvenil ve yetişkin balıklarda doku dejenerasyonları, virus konsantrasyonu artması halinde de hafif görülmektedir (Mladineo, 2003).

VNN enfeksiyonunda özellikle larva dönemindeki balıklarda mortalite %100'e ulaşmaktadır. Enfekte hayvanlarda anormal yüzme davranışları (spiral, dairesel yüzme, karın yukarda, dengesiz, koordine olmayan yüzme) tank duvarlarına çarpma, anemi, letarji, anoreksi görülmektedir (Munday et al., 2002; Nopadon et al., 2009; Binesh, 2013b).

İmmersiyon yöntemiyle enfekte edilen kral balıklarında vakuol oluşumu ilk olarak omurilikte, sonra beyinde, daha sonra retinada gözlenmiştir. Doğal enfekte genç larvalarda enfeksiyonun erken döneminde deride ve barsak epitel hücrelerinde virus tespit edilmiştir (Nguyen et al., 1996).

2.1.9. Teşhis

Virus izolasyonu

VNNV'nin ilk kez görülmesinin ardından birçok teşhis metodu geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Güncel metodlardan önce hastalık 1990'larda, enfekte balığın gösterdiği anormal yüzme davranışları ve patolojik muayenede görülen semptomlar (yüzme kesesinde inflamasyon, beyinde hemoraji) ile tahmin edilmiştir (Yoshikoshi and Inoue, 1990; Breuil et al., 1991; Chi et al., 1997). Daha sonra mikroskopik

muayenede beyin ve omurilikte vakoullerle desteklenmiştir. Elektron mikroskobu ile de virus, enfekte balık dokularındaki hücrelerde serbest halde veya endoplazmik retikulum zar yüzeyinde görülerek teşhisi konmuştur (Glazebrook et al., 1990; Grotmol et al., 1997). Daha sonra fry boydaki Striped snake head'den (*Channa striatus*) elde edilen hücre hattı (SSN-1) kullanılarak virus izolasyonu yapılmaya başlanmıştır (Frerichs et al., 1996). SSN-1 hücre hattı, balığın tamamından elde edildiği için farklı dokulardan hücreler bulundurmakta ve SnRV (Snakehead fish retrovirus) adı verilen bir retrovirus-C ile persiste enfektidir (Frerichs et al., 1991). Bunun NNV tespitinde hücrenin performansını ve CPE'deki güvenilirliği azalttığı düşünülerek SSN-1 klonu olan E-11 hücre hattı geliştirilmiştir. E-11, SSN-1 e göre daha stabildir ve SnRV yönünden moleküler olarak pozitif olsa da viral partikül oluşturmamaktadır (Iwamoto et al., 2000). Daha sonra orfoz yüzgecinden (*Epinephelus coioides*) GF-1 (Chi et al., 1999) izolasyon çalışmalarında devamlı hücre hattı olarak kullanılmıştır ve tavsiye edilmektedir (WOAH, 2019). Son yıllarda birçok hücre hattının VNN izolasyonunda kullanılabileceği gösterilse de yaygın olarak kullanılanlar SSN-1 ve E-11'dir. Hücre kullanılarak yapılan identifikasyon çalışmaları uzun sürdüğü, tecrübe istediği ve virus titresinin düşük olduğu durumlarda negatif sonuca sebebiyet verebildiği için son yıllarda serolojik ve moleküler çalışmalar önem kazanmıştır (Doan et al., 2017).

Immunohistokimyasal Boyama (IHC)

VNN teşhisinde IHC için farklı protokoller geliştirilmiştir (Nguyen et al., 1996; Dannevig et al., 2000; Johansen et al., 2002; Moody et al., 2004). Ancak kullanılan kromojen ve konjugat boyalarının test değerlendirmesinde zorluk çıkarabilmesi, düşük antikor yoğunluklarının yanlış sonuç verebilmesi sebebiyle daha spesifik testler kullanılmaktadır (Johansen et al., 2004).

İmmun Floresan Antikor Testi (IFAT)

IFAT, VNN antijenlerini sinir dokularında ve hücre kültürlerinde teşhis etmek için kullanılmaktadır (WOAH, 2019). IHC'ye göre spesifitesi daha yüksektir. IHC sonuçlarının negatif olduğu kas ve bağ dokularda IFAT ile pozitif bulunmuştur. IFAT floresan mikroskop gerektirdiği için IHC'ye göre maliyeti yüksektir ve WOAHA'ya göre sensivite yönünden geçerli görülmediği için sadece klinik enfekte hayvanlarda kullanılması tavsiye edilmiştir (Azad et al., 2006; WOAHA, 2019).

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Farklı ELISA protokolleri, yumurtalarda, larvalarda ve anaç balıklarda VNN antijen tespitinin yanı sıra, balık serumlarında bulunan VNN antikolları yönünden bilgi vermesi için geliştirilmiştir (Arimoto et al., 1992; Breuil et al., 2000; Watanabe et al., 2000; B Fenner et al., 2006; Jaramillo et al., 2016). B Fenner et al. (2006) yaptıkları çalışmada antijen yakalamalı ELISA'da 10^3 - 10^4 TCID₅₀/50 µl üniteye kadar tespit edebildiklerini göstermiştir. Watanabe et al. (2000), ELISA titresinin $\geq 1:40$ değerinin viral enfeksiyonu, $\leq 1:10$ değerinin viral enfeksiyon olmadığını gösterdiğini bildirmiştir. ELISA metodu balıkların öldürülmeden yapılabildiği ve sürü kontrolü sağlama açısından avantajlıdır (Jaramillo et al., 2016; Nuñez-Ortiz et al., 2016).

Moleküler Metodlar

VNN tespitinde birçok RT-PCR protokolü tanımlanmıştır. İlk RT-PCR metodu SJNNV genotipindeki RNA2'nin T4 değişken bölgesinde 430 bp'lik bir alana göre tasarlanmıştır (NishizawaT. et al., 1994). Bu protokol WOAHA tarafından 2006 yılına kadar teşhiste ve genotiplendirmede tavsiye edilmiş ve kullanılmıştır (Nishizawa et al., 1995b; Nishizawa et al., 1997). Ancak bu metod kullanılırken, viral yükün düşük olduğu durumlarda teşhiste problemler ve T4 değişken bölgeden dolayı sensitivite problemleri yaşanmıştır (Nishizawa et al., 1996). Daha sonra sensitivitesi daha yüksek ve sonuçlanması daha az zaman alan, RNA1 ve RNA2'yi tanıyan birçok primer ve prob geliştirildi (Dalla Valle et al., 2005; BJ Fenner et al., 2006; Hick and Whittington, 2010; Panzarin et al., 2010; Hodneland et al., 2011; Baud et al., 2015). Özellikle son zamanlarda VNN genotiplerindeki virusları tanıyan ve WOAHA tarafından da tavsiye edilen, Panzarin et al. (2010) tarafından bildirilmiş TaqMan RT-qPCR protokolü kullanılmaktadır. 2016 yılında Hwang et al. (2016), *Epinephelus septemfasciatus* cinsi balıklarda VNN teşhisinde, PCR metoduna göre on kat daha hassas bulduğu LAMP (loop-mediated isothermal amplification) protokolünü bildirmiştir.

VNNV teşhis yönteminin duyarlılık, uygulanabilirlik ve maliyet açısından değerlendirilerek seçilmesi konusunda WOAHA tarafından önerilen tercihler Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. WOAH'ın önerdiği test metodları ve kullanılabilirlikleri (a: bulunabilirlik kullanılabilirlik ve spesifite yönünden önerilen metod, b:önerilen standart metod, c: bazı durumlarda uygulanabilir ancak maliyet ve duyarlılık açısından uygulanabilirliği kısıtlıdır, d: bu metod önerilmemektedir.) (WOAH 2019'dan uyarlanmıştır.)

Metod	Hedefli Sürveyans	Olası Tanı	Kesin Tanı
Histopatoloji	d	b	d
Histopatoloji ve immunboyama	d	b	d
Elektronmikroskopu	d	c	d
Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu ve İmmunboyama veya RT-PCR	a	a	a
RT-PCR	b	a	a
RT-PCR ve sekanslama	d	b	a
Real Time PCR	a	a	a

2.1.10. Koruma ve Kontrol

Akuakültür ortamında virus enfeksiyonlarının kontrolü ve korunması son derece zordur. VNNV enfeksiyonlarında terapötik ilaçlar bulunsa da virus girişini, yayılmasını ve kalıcılığını önlemek için daha çok; hijyen kurallarına uyulması, biyogüvenlik önlemlerinin uygulanması, enfekte olmuş popülasyonların eradikasyonu ve geliştirilmiş aşılardan yararlanılmasına yoğunlaşmaktadır (Gomez-Casado et al., 2011; Shetty et al., 2012).

Viral balık enfeksiyonları arasında VNNV, çevre şartlarına dayanıklı bir virustur. Konakçı dışında suda 15°C'de 6 aydan fazla aktif kalabilmektedir (Frerichs et al., 2000). Virus inaktivasyonunda sıcaklık, UV ve belirli kimyasallar etkilidir. Virus 60°C'de 30 dakika veya 440 mW/cm² UV ışığa 10 dakika maruz bırakıldığında inaktive olmaktadır. Virus ayrıca, sodyum hipoklorit, kalsiyum hipoklorit, benzalkonyum klorit, iyodin ve ozon kullanılarak kimyasal yolla da inaktive edilebilir (Arimoto et al., 1996; Frerichs et al., 2000; Buchan et al., 2006). Betanodaviruslar formalin, kloroform ve etere dirençlidir ancak pH 2'nin altında ve 11'in üzerinde aktif kalamazlar (Arimoto et al., 1996; Frerichs et al., 2000).

Virusun vertikal yolla bulaşabilmesinden dolayı kuluçkahanelerde virusun önemli bulaşma yollarından biri de enfekte ve asemptomatik damızlık balıklardır (Mushiake et al., 1994; Watanabe et al., 1998). Ozon uygulaması inaktivasyonda

önemli olsa da virusun yumurta yüzeyinde değil, içinde de bulunmasından ve spermle de bulaşmasından dolayı %100 etkili değildir (Kuo et al., 2012). Vertikal bulaşmanın önüne geçebilmek için, kuluçkahanedeki damızlık balıkların ve yeni alınacak damızlıkların düzenli olarak taraması yapılmalı ve üretimde virus antijen-antikor negatif balıklar kullanılmalıdır. Balık kanlarından ELISA testi ile virusa karşı antikor taraması, yumurtalık ve spermde RT-PCR ile viral RNA taraması, elde edilen larvalardan da kontrol için RT-PCR taraması yapılmalıdır (Mori et al., 1998; Panzarin et al., 2010). Fertilize edilmiş yumurtaların dezenfeksiyonu, larval ve juvenil safhalarda suyun kontrolü için ozon, UV ve elektrolize edilmiş su kullanılmalıdır (Arimoto et al., 1996; Watanabe et al., 1998; Watanabe et al., 2013). Vertikal bulaşmayı önlemek için damızlık balıkların aşılama da son derece önemlidir (Arimoto et al., 1992; Mushiake et al., 1994; Breuil et al., 2000).

VNNV enfeksiyonuna karşı birçok balık türünde rekombinant, inaktif, DNA ve virus benzeri partikül (VLP) aşısı denenmiş ve farklı sonuçlar alınmıştır (Gomez-Casado et al., 2011). WOAHA bildirimine göre dünyada ticari olarak Japonya’da VNN’e karşı inaktif RGNNV aşısı kullanıldığı belirtilse de son yıllarda İspanya merkezli Hipra firmasının inaktif RGNNV (Ichthovac® VNN) ve Norveç merkezli Pharmaq firmasının inaktif RGNNV (Alpha Ject micro® 1 Noda) aşısı, ticari olarak sunulmuş ve birçok akdeniz ülkesinde (Fransa, Hırvatistan, Yunanistan, İtalya, İspanya) resmi olarak kullanılmaktadır. İki aşı da 12-15 gramdan büyük juvenil balıklara enjeksiyon yoluyla uygulanmaktadır ve ölümleri önemli ölçüde azalttığı ancak yine de tam koruma sağlamadığı görülmektedir (Padrós et al., 2022).

Aşılamının, enfeksiyondan en çok etkilenen larval ve fingerling dönemdeki balıklara uygulanması, henüz immun sistemlerinin tam olarak gelişmemiş olması ve enjeksiyon yoluyla immunizasyonun kısıtlı olması nedeniyle son derece zordur. Bunu kolaylaştırmak için, immersiye yoluyla verilen inaktif VNNV aşısı (Kai and Chi, 2008) ve oral yolla verilen bakteride (*Vibrio anguillarum*) eksprese edilmiş ve Artemia besini ile kapsüllenmiş rekombinant VNNV kapsid proteini (Lin et al., 2007; Chen et al., 2011) denenmiş ve yüksek relatif hayatta kalma oranları (RPS -relative percentage survival) elde edilmiştir. İmmersiye yoluyla verilen inaktif aşıda %79-95, oral yolla verilen rekombinant aşıda %69,5 RPS görülmüştür. Ayrıca üreme sezonundan bir ay önce kas içi enjeksiyonla inaktif VNNV ile aşılamının, vertikal bulaşmayı önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (Kai et al., 2010).

Yapılan çalışmalarda VNNV'ye karşı DNA aşıları, istenen RPS oranlarını uzun süreli olarak vermemektedir. Vimal et al. (2014) yaptıkları çalışmada baramundi juvenillerine oral yolla geliştirdikleri DNA aşısını vermiş ve %60 RPS oranı elde etmiştir. Bazı çalışmalarda farklı virusların DNA aşıları uygulanan balıklarda non spesifik immun yanıtın geliştiği görülmüştür. IHNV (İnfeksiyöz Hematopoetik Nekrozis Virus) DNA aşısı yapılan 2,2 gram ağırlığındaki kalkanlarda aşılamadan 8 gün sonra yapılan eprüvasyonda %100, 35 gün sonra yapılan eprüvasyonda %63 RPS oranı görülmüştür (Sommerset et al., 2003).

Aşılama çalışmalarının sonuçları umut vericidir. Bu çalışmalar yapılırken aşılama yöntemlerinin getirdiği avantaj ve dezavantajlar da göz önünde bulundurulmalıdır. Enjeksiyon yoluyla aşılama ile larva ve juvenil balıkların aşılanması mümkün olmasa da, Avrupa levreği ve orfoz gibi VNNV'ye karşı yaşamının her döneminde hassas olan balıklar için kullanışlı olabilir. Oral ve immersiyon yoluyla aşılama larva ve juvenil balıkları aşılama için geliştirilmiş olsa da, aşılamadan sonra etkili immun cevabın verilmesi uzun sürmektedir. Bazı türlerde immun cevap on haftayı bulabilmektedir (Húsgar et al., 2001).

VNN enfeksiyonunda birçok terapötik kimyasal geliştirilmiş ve denenmiş, geliştirilirken başta tedavi ve konakçı immun sistemini uyarmaya odaklanılmıştır. Antimikrobiyal peptidlerin (AMP) konakçı immun sistemini güçlü şekilde uyardığı ve tedavide kullanılabileceği önerilmiştir. Özellikle balıklara TH1-5 (tilapia hepcidin 1-5) ve Epi-1 (epinedicin-1) enjeksiyon yoluyla verildiğinde TH1-5'in viral yükü büyük oranda düşürdüğü, Epi-1'in enfeksiyondan önce veya sonra verilmesiyle viral yükü temizlediği rapor edilmiştir (Wang et al., 2010; Wang et al., 2015). Kullanılan antivirallerden anti-RdRp olan Ribavirin, in vitro ortamda denenmiş ve RGNNV RdRp'si ile etkileşime girerek enfeksiyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Huang et al., 2016). Tıbbi bir mantardan (*Ganoderma lucidum*) elde edilen rekombinant protein (LZ-8), balık diyetlerine yüksek dozlarda verildiğinde (37.5 mg/kg) IFN- α , IL-1 β ve sitokin salınımını, oksidatif ve fagositik aktiviteyi artırarak deneysel VNNV enfeksiyonunda yüksek kurtulma oranları elde edildiği ortaya konmuştur (Kuan et al., 2012).

2.2. Amaç

Bu tezin amacı ve gerekçesi;

Betanodavirus enfeksiyonunun ülkemizde Karadeniz Bölgesi'nde yabani hayattaki varlığı ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile bazı balık türlerinde önemli ekonomik kayıplara yol açan Betanodavirus enfeksiyonunun, Türkiye'de Karadeniz Bölgesi'nde avlanan balıklardaki varlığının moleküler yöntemlerle araştırılması, hücre kültüründe izolasyonu ve sekans analizinin yapılarak filogenetik karakterinin ortaya konulması amaçlanmaktadır.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Balık Örneklemesi

Bu çalışmada, epidemiyolojik araştırma amacıyla Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinde bulunan 6 kıyı ilinde (Sinop, Samsun, Ordu, Giresun, Trabzon ve Rize) çeşitli marketler, semt pazarları ve balık hallerinden mevsimsel avlanma dönemleri ve balık tüketimindeki yaygın tercihler göz önüne alınarak 2019-2020 balık av sezonu içinde avcılığı yapılan, WOAİ tarafından listelenmiş olan hastalığa duyarlı 5 balık türü (mezgit, barbunya, levrek, kefal, istavrit) ve henüz bildirimi yapılmamış ancak duyarlı olabileceği düşünülen 3 balık türünden (hamsi, zargana, alabalık) olmak üzere 8 balık türünden (Tablo 3.1) 253 havuz olmak üzere 1265 balık örneklemesi yapıldı. Sahadan toplanan balıklar soğuk zincir altında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Laboratuvarı ve Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Viroloji Laboratuvarı olmak üzere iki laboratuvar da bekletilmeden analiz edildi.



Şekil 3.1. Balık örneklerinin toplandığı iller

Tablo 3.1. Örneklenen balık türleri ve şehirler. (Parantez içlerindeki rakamlar (6) oluşturulan havuz sayılarını belirtmektedir. Her havuzda 5 balık homojenatı bulunmaktadır.)

SİNOP	SAMSUN	ORDU	GİRESUN	TRABZON	RİZE
Zargana(6)	Zargana(6)	Zargana(6)	Zargana(6)	Zargana(6)	Zargana(6)
İstavrit(6)	İstavrit(6)	İstavrit(6)	İstavrit(6)	İstavrit(6)	İstavrit(6)
Mezgit(6)	Mezgit(6)	Mezgit(6)	Mezgit(6)	Mezgit(6)	Mezgit(6)
Hamsi(6)	Hamsi(6)	Hamsi(6)	Hamsi(6)	Hamsi(6)	Hamsi(6)
Barbunya(6)	Barbunya(6)	Barbunya(6)	Barbunya(6)	Barbunya(6)	Barbunya(6)
Levrek(6)	Levrek(6)	Levrek(6)	Levrek(6)	Levrek(6)	Levrek(6)
Kefal (6)	Kefal (6)	Kefal (6)	Kefal (6)	Kefal (6)	Kefal (6)
Alabalık(6)					
Toplam Havuz Sayısı 253, Örnek Sayısı 1265					

Tablo 3.2. Örneklenen balık türlerinin ortalama boy (cm) ve ağırlıkları (gr)

Balık Türleri	Ortalama Balık Boyları	Ortalama Balık Ağırlıkları
Mezgit	11 cm	11 gr
İstavrit	15 cm	23 gr
Zargana	30 cm	42 gr
Hamsi	8 cm	6 gr
Barbunya	12 cm	12 gr
Levrek	21 cm	320 gr
Kefal	22 cm	307 gr
Alabalık	22 cm	313 gr

3.1.2. Hücre Kültürü

Virus izolasyon çalışmasında, İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, Viroloji Laboratuvarından temin edilen SSN-1 (Striped Snakehead) ve SSN-1 klonu E-11 hücre hatları kullanıldı. Hücre hattında ve virus izolasyonunda, % 1 antibiyotik (Gibco, Kat. No: 15140-122, ABD) ve % 5-10 fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Amerika Birleşik Devletleri, Kat. No: A4736201) içeren Leibovitz- 15 (L-15) (Gibco, ABD, Ref: 11415-049) besiyeri kullanıldı.

3.1.3. RNA Ekstraksiyonu, RT-PCR, rRT-PCR Kitleri, Primerler ve Prob

RNA ekstraksiyonu için ticari olarak temin edilen ekstraksiyon kiti (Thermo Fisher Scientific, GeneJET RNA Purification Kit, Vilnius, Lithuania, Kat No: K0732), kullanılarak üretici firmanın direktifleri doğrultusunda organ homojenatlarından nükleik asit ekstraksiyonu yapıldı. RT-PCR ve rRT-PCR reaksiyonları için ticari olarak temin edilen PCR kitleri (QIAGEN OneStep RT-PCR Kit, Kat. No: 210212, Almanya ve Biorad, iTaq Universal Probes One-Step kit, Kat. No: #1725141, ABD),

primerler ve prob kullanılarak nükleik asit tespiti yapıldı. RT-PCR ve rRT-PCR reaksiyonlarında, Panzarın ve ark.'nın (2010) Betanodavirus için tasarladıkları, WOAH tarafından da tavsiye edilen RNA2 segmentini tanıyan primer çiftleri, ticari olarak dizdirilerek kullanılmıştır. Nükleik asit tespiti için kullanılan primer çiftleri ve probun dizilimleri ve lokasyonları ile ilgili bilgiler Tablo 3.3'de sunulmaktadır.

Tablo 3.3. Teşhiste kullanılan primer-prob bilgileri

Yöntem	Primer	5' → 3' Dizilim	Lokasyon	Amlikon Büyükülüğü	Referans
Real-Time RT-PCR	VNN RNA2 Forward	CAACTGACARCGAHCACAC	392–410 bç	69 bç	(Panzarin ve ark., RNA2 2010)
	VNN RNA2 Reverse	CCCACCAYYTTGGCVAC	445–460 bç		
	VNN RNA2 Prob	FAM- TYCARGCRACTCGTGGTGCVG -TAMRA	422–442 bç		
RT-PCR	Noda WOAH Forward (RNA2)	GACTGGGACACGCTGCTAGA	114-133bç	349 bç	(Panzarin ve ark., RNA2 2010)
	Noda WOAH Reverse (RNA2)	AGTCGAACACTCCAGCGACA	443-462 bç		

3.1.4. Dizi Analizi ve Kullanılan Primerler

Dizilemesi yapılacak pozitif bulunan örnek, daha kapsamlı bilgi vermesi amacıyla PCR ürün uzunluğunu artıracak daha geniş bir genom alanını tanıyan primerlerle reaksiyona sokuldu. Dizilemesi yapılacak örnek, BamHI (5'GGATCC3') ve KpnI (5'GGTACC3') kesim bölgeleri eklenmiş ve Betanodavirusun RNA2 segmentinin kapsid proteinini kodlayan bölgeyi tanıyan primerler ile reaksiyona sokuldu. Daha sonra aynı örnek genbankta bulunan sekans verileri kullanılarak tarafımızca tasarlanan, dört genotipin de RNA1 segmentinin kısmi bir bölgesini tanıyan primerler ile PCR reaksiyonuna sokuldu. Örneğin PCR atılan iki segmenti de (RNA1/RNA2) genotip tayini için ticari firmadan (BM Yazılım Danis. ve Lab. Sis. Ltd. Şti. Ankara, Türkiye) hizmet alımı yapılarak sekans dizilemesi tamamlandı. Dizileme işlemi tablo 3.4'te gösterilen primerlerle yapıldı.

Tablo 3.4. Kullanılan primer-prob bilgileri

	Primer	5' → 3' Dizilim	Lokasyon	Amlikon Büyükülüğü	Referans
RT-PCR	NodaBamHI F (RNA2)	CGCGGATCCATGGTACGCA AAGGT	27-41 bç	1017 bç	(Ciulli ve ark. 2006)
	NodaKpnI R (RNA2)	CCCACCAATTGGGCVAC	999-1020 bç		
RT-PCR	VNN RNA1 F	CGATATCACGATGAGTTCAC TATG	1582-1605bç	1357 bç	Tarafımızca tasarlanmıştır .
	VNN RNA1 R	GGCGCTTATCACGAACG	2880-2896 bç		

3.1.5. Plazmid Klonlama

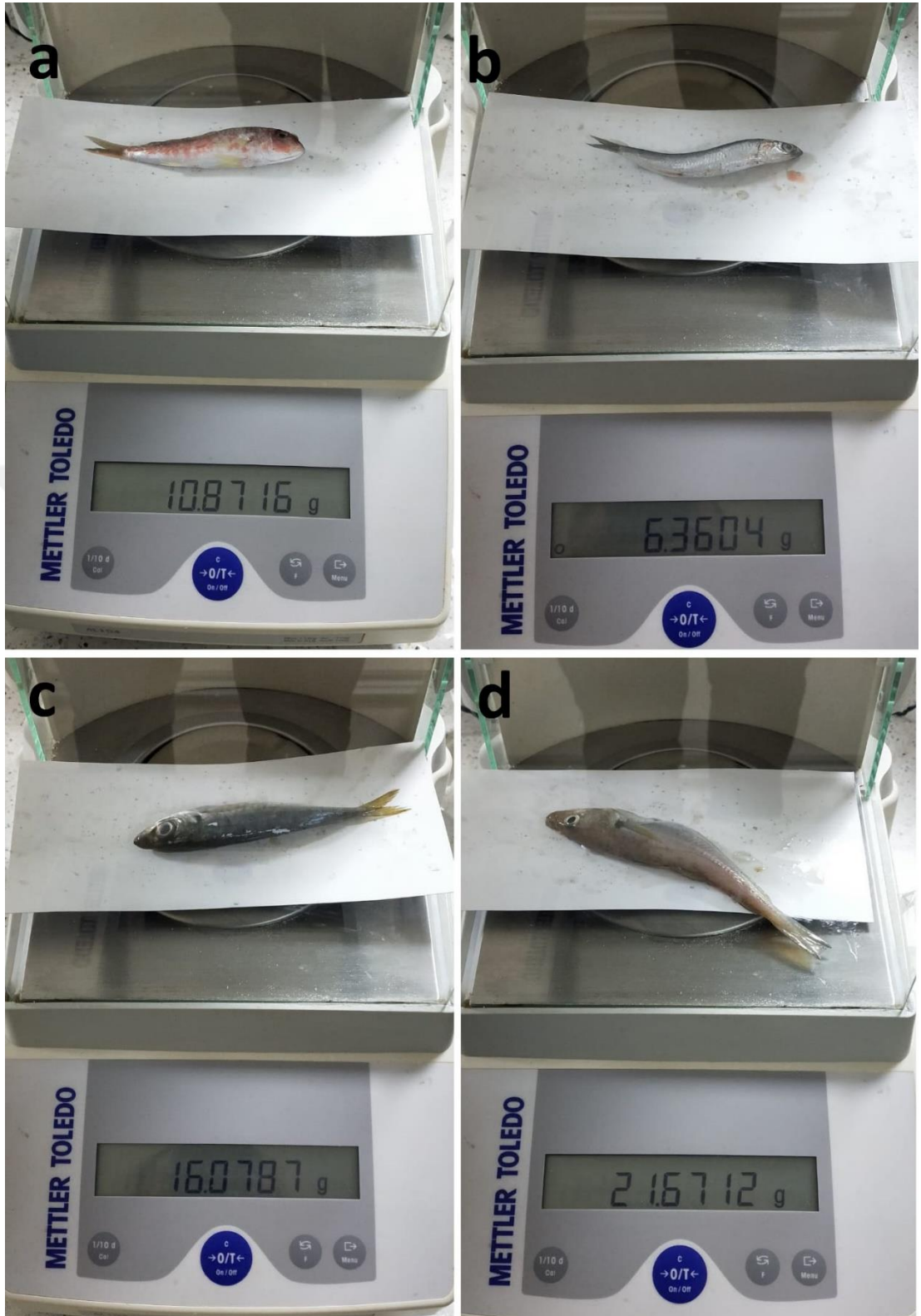
RNA2 segmentinin kapsid proteinini kodlayan bölge, çevre şartlarına dayanıklılığı artırmak ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere pGEM-T Easy Vector Systems plazmid kiti kullanılarak pGEM-T Easy plazmidine (Promega, Kat No:A1360 ABD) klonlandı.

Transformasyon işleminde plazmidin transforme edileceği hücre olarak *Escherichia coli* JM109 hücresi (Promega, Kat No:L2005, ABD) kullanıldı.

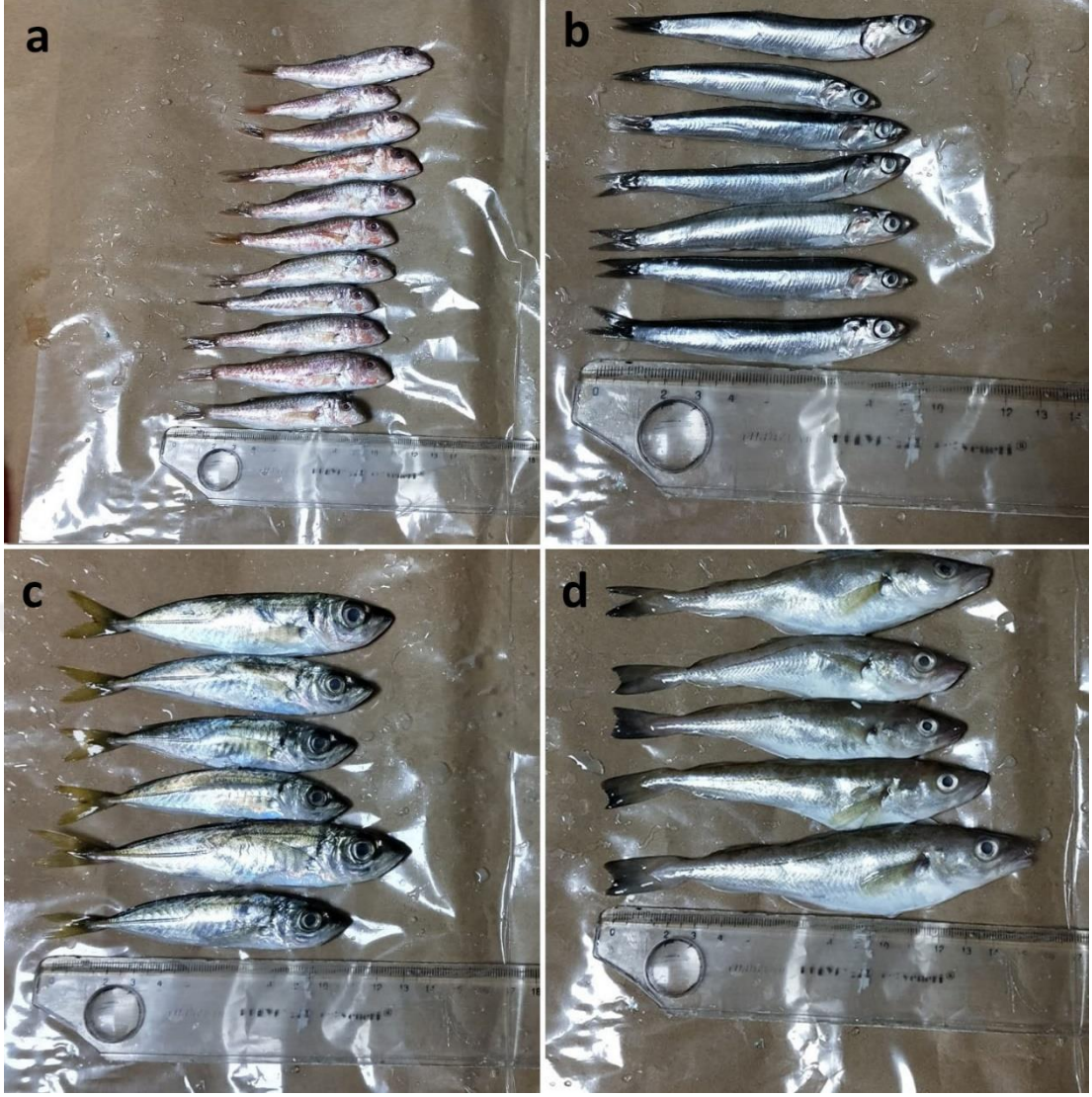
3.2. Metod

3.2.1. Homojenatların Hazırlanması

Toplanan balıkların uzunluk ve ağırlık ölçümleri yapıldı. Steril kaplarda steril makas ve pens yardımıyla elde edilen göz ve beyin dokuları, bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Daha sonra her beş balıktan alınan dokular bir tüpte toplanmak üzere doku parçaları, 2ml'lik ependorf tüplere aktarıldı ve üzerine %1 antibiyotik (Gibco, Kat. No: 15140-122, ABD) içeren PBS (Phosphate Buffer Saline) (Gibco, Kat No: 14190-094, İngiltere) eklendi. Doku parçalayıcı kullanılarak tüp içerisindeki dokular, steril çelik boncuklar (Qiagen, Kat No: 69989, Hilden, Almanya) yardımıyla PBS ile tamamen homojenize olacak şekilde parçalandı. Soğutmalı santrifüj makinesi kullanılarak +4°C'de 15 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerden süpernatantlar pipet yardımıyla çekildi ve PCR aşamasına kadar -80C'de tutuldu.



Şekil 3.2. Balık ağırlık ölçümleri. a; barbunya. b; hamsi. c; istavrit. d; mezgit



Şekil 3.3. Balık uzunluk ölçümleri. a; barbunya. b; hamsi. c; istavrit. d; mezgit.



Şekil 3.4. Balıklardan göz ve beyin dokularının alınması.

3.2.2. RNA Ekstraksiyonu

Ticari ekstraksiyon kiti, GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, GeneJET RNA Purification Kit, Vilnius, Litvanya, Kat No: K0732), kullanılarak, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda nükleik asit ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Bunun için; homojenat süpernatantından 200 µl çekilerek 2 ml'lik tüpe alındı. 6 µl β-merkaptoetanol (Kat. No: M3158, Almanya) içeren “Lyses buffer” dan 600 µl eklendi ve 10 sn vorteks cihazında karıştırıldı. Tüpe 360 µl %96 alkol eklendi ve pipetle karıştırıldı. İçerikten 700 µl alınarak filtreli spin kolona aktarıldı. Spin kolon, santrifüj cihazıyla (Sigma 1-14 Mini Centrifuge, Almanya) 13000 rpm de 1 dk santrifüj edildi. Alt kısımda süzölmüş sıvı bulunan toplama tüpü atıldı. Spin kolonlar yeni boş toplama tüplerine yerleştirildi. “Lyses Buffer” ve %96 alkol içeren karışım bitene kadar aynı filtreli spin kolona 700 µl koyularak işlem tekrarlandı. Karışımın süzölme işlemi tamamladıktan sonra filtreli spin kolonlara 700 µl “Wash Buffer 1” eklendi ve 12000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü uzaklaştırıldı ve filtreli spin kolon yeni toplama tüplerine yerleştirildi. 600 µl “Wash Buffer 2” eklendi ve tekrar 12000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü uzaklaştırıldı ve filtreli spin kolon yeni toplama tüplerine yerleştirildi. 250 µl “Wash Buffer 2” eklendi ve 12000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi. Bu aşamadan sonra toplama tüpü atıldı ve filtreli spin kolon, yeni 1,5 ml’lik RNase içermeyen steril tüplere yerleştirildi. 75 µl RNase içermeyen steril disitile su eklendi ve 14800 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Filtreli spin kolon atıldı. Homojenat RNA’sını içeren 1,5 ml’lik tüp alınarak PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere -20°C’ de muhafaza edildi.



Şekil 3.5. Balık homojenatlarından RNA ekstraksiyonu

3.2.3. Real Time RT-PCR

Real Time RT PCR için ticari olarak temin edilen Biorad, iTaq Universal Probes One-Step kiti kullanılarak mastermix hazırlandı. rRT PCR Biorad CFX Connect Real Time System (Biorad, North Carolina, ABD) cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 3.5. rt RT-PCR Master Mix içeriği

Master Mix	Hacim
2X Master Mix	10 µl
Forward Primer (10µM)	1 µl
Reverse Primer (10µM)	1 µl
Probe (10µM)	0,5 µl
Reverse Transcriptase	0,5 µl
Distile Su	5 µl
RNA	2 µl
Toplam	20 µl

Karışım buz aküsünde hazırlandı. 0,2 ml hacimli saydam kapaklı PCR tüplerine 18'şer µl dağıtıldıktan sonra her tüpe 2'şer µl örnek RNA'sı, pozitif kontrol ve negatif kontrol pipet yardımıyla karıştırılarak eklendi. Daha sonra kapakları kapatılarak rt-RT-PCR cihazına yerleştirildi. 50°C'de 10 dakika, 95°C'de 10 saniye, 54°C'de 30 saniye, 72 °C'de 1 saniye süren program 45 döngü tekrarlandı. Sonuçlar gerçek zamanlı olarak bilgisayar ekranında takip edildi.

3.2.4. Konvansiyonel RT-PCR

RT-PCR için ticari olarak temin edilen QIAGEN OneStep RT-PCR Kit kiti kullanılarak mastermix hazırlandı. RT PCR, ısı siklus cihazında (Cleaver Scientific, GTC96S Thermal Cyclers, İngiltere) gerçekleştirildi.

Tablo 3.6. RT-PCR Master Mix içeriği

Master Mix	Hacim
5X Master Mix	10 µl
Forward Primer (10µM)	3 µl
Reverse Primer (10µM)	3 µl
dNTP mix (10mM)	1,5 µl
Reverse Transcriptase	1,5 µl
Distile Su	26 µl
RNA	5 µl
Toplam	50 µl

Karışım buz aküsünde hazırlandı. 0,2 ml hacimli PCR tüplerine 45'er µl dağıtıldıktan sonra her tüpe 5'er µl örnek RNA'sı, pozitif kontrol ve negatif kontrol pipet yardımıyla karıştırılarak eklendi. Daha sonra kapakları kapatılarak RT-PCR cihazına (Cleaver Scientific, GTC96S Thermal Cycler, İngiltere) yerleştirildi. RNA1 primerleri için; 50°C'de 30 dakika, 95°C'de 10 dakika Reverz Transkriptaz aşamasından sonra, 94°C'de 30 saniye, 56 °C'de 45 saniye, 72 °C'de 45 saniye süren döngü 35 defa tekrarlandıktan sonra 72°C'de 10 dk süren son uzama bölümü uygulandı. RNA2 primerleri için; 50°C'de 30 dakika, 95°C'de 10 dakika Reverz Transkriptaz aşamasından sonra, 94°C'de 1 dakika, 58 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 70 saniye süren döngü 35 defa tekrarlandıktan sonra 72°C'de 10 dk süren son uzama bölümü uygulandı. Sonuçlar jel görüntüleme cihazında değerlendirildi.

10 µl PCR son ürününden alınarak, 2 µl 6X yükleme boyasıyla (Thermo, 6x Loading Dye, Kat No: R0611) karıştırıldı. Daha sonra karışım, Tris-asetik asit-EDTA (TAE) ile hazırlanan 0,5 µg/ml ethidium bromide (Sigma, Kat No: 7637, Almanya) içeren % 1,5'lik agaroz (Sigma, Kat No: A9539 ABD) jel kuyucuğuna aktarıldı. Ürün uzunluğunun belirlenebilmesi için kılavuz olarak 100 bp'lik DNA merdiveni (New England BioLabs, Kat No: N3231S, Avusturalya) kullanıldı. Ürün ve kılavuz yüklü jel 80 Voltta 40 dakika yatay elektroforezde (Cleaver Scientific, CS-300V, İngiltere) elektrik alana tabi tutuldu. İşlem tamamlandıktan sonra jel alınarak transilluminator cihazına yerleştirildi. (Vilber lormat, Sigma, Almanya) DNA bantları UV ışık altında değerlendirildi.

3.2.5. PCR ürününün Plazmide Klonlanması

Pozitif örneğin sonraki laboratuvar çalışmalarında kullanılması ve daha stabil bir ürün elde etmek için PCR ürünü T4 DNA ligaz enzimi aracılığıyla pGEM-T vektörüne klonlandı. Seçilen vektör küt uçlu klonlama yapılmaya uygun olduğu için herhangi bir kesim işlemi uygulanmadan klonlamaya başlandı. Ligasyon işleminde 0,2 ml hacimli tüpte hazırlanan karışımın toplam hacim 20 µl olacak şekilde; 10 µl 2x rapid ligasyon buffer, 2 µl T4 DNA ligaz (1U/µl), 6 µl VNN pozitif PCR ürünü, 2 µl pGEM-T easy plazmid (50ng/µl) pipet yardımıyla karıştırıldıktan sonra 25°C de 2 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.6. Plazmidin *E.coli* Hücrelerine Transformasyonu

Transformasyon işlemi için JM109 hücresi (Promega, Kat No: L2005) kullanıldı. Üretici firma protokolüne uygun olarak; 2 saat inkübe edilmiş ligasyon tüpüne 50 µl JM109 hücresi eklendi ve 20 dk buz içinde tutuldu. Daha sonra 45 saniye 42°C deki su banyosunda bekletildi ve ivedilikle tekrar buza alınarak 2 dakika süreyle buzda tutuldu. Tüp, tüp tutucuya alınarak üzerine 250 µl SOC Medium (Invitrogen, Kat no:15544034) eklendi. Daha sonra karışım 37°C'lik inkübatör içinde dairesel çalkalayıcıya alınarak 250 rpm hızda 1 saat inkübe edildi. 1 saat sonunda karışım, önceden hazırlanmış bulunan X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-galaktopiranosid) ve ampicilin (100 ug/ml) içeren petri kabındaki Luria Bertani (LB) agarın üzerine pipetle koyularak yayıldı. Agar üzerindeki karışımın bir miktar kuruması için beklendikten sonra 37°C'lik inkübatörde bir gece inkübe edildi. Ertesi gün petri kabındaki koloniler incelendi. PGEM-T easy plazmidinde yer alan lacZ geninden dolayı transformasyon işlemi gerçekleşmiş koloniler beyaz, diğer koloniler ise mavi renkli olarak değerlendirildi.

3.2.7. Plazmidin Saflaştırılması ve Doğrulanması

Transformasyonu gerçekleşmiş kolonilerin tayini için, agardaki beyaz kolonilerden dört adet seçildi. Her koloni ayrı tüplerde 4 ml LB/amp (100 µg/ml ampicilin) sıvı besi yerine alındı. Çalkalamalı inkübatörde 250 rpm'de, 37°C'de bir gece boyunca inkübe edildi. Ertesi sabah, plazmidin hücreden alınma işlemi GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo, Kat No:K0503) protokolüne göre gerçekleştirildi. Bunun için; etüvde bulunan tüpler alınarak her bir tüp ayrı ayrı olacak şekilde, 2 ml'lik tüplerde iki kez bölünerek 13000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatantlar dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. 2ml'lik tüplerde kalan bakteri pelleti üzerine 250 µl

“Resuspension Solution” eklendi ve 20 saniye kadar vortekslendi. Daha sonra 250 µl “Lysis Solution” eklendi ve tüpler 5-6 defa el ile altüst edildi. 350 µl “Neutralization Solution” eklenerek tekrar 5-6 defa el ile altüst edildi. Daha sonra tüp 13000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Bakteri içindeki plazmidlerin parçalanarak süpernatanta karıştığı bu aşamadan sonra süpernatant çekilerek filtreli spin kolona aktarıldı. Daha sonra 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek alttaki toplama tüpü atıldı. Yeni toplama tüpüne yerleştirilerek üzerine 500 µl “Wash Solution” eklendi ve tekrar 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Son işlem aynı şekilde bir kez daha tekrarlandıktan sonra spin kolonları bir kez daha sıvı eklenmeden 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Filtreli spin kolonlar steril 1,5 ml’lik yeni tüplere koyulduktan sonra 50 µl “Elution Buffer” eklendi, 2 dakika oda ısısında bekletildi ve 2 dakika 13000 rpm’de santrifüj edildi. Filtreli spin kolon atılarak 1,5 ml’lik tüpte kalan 50 µl plazmid DNA’sı kesim işlemiyle pozitifliği tayin edilene kadar -20°C’de saklandı.

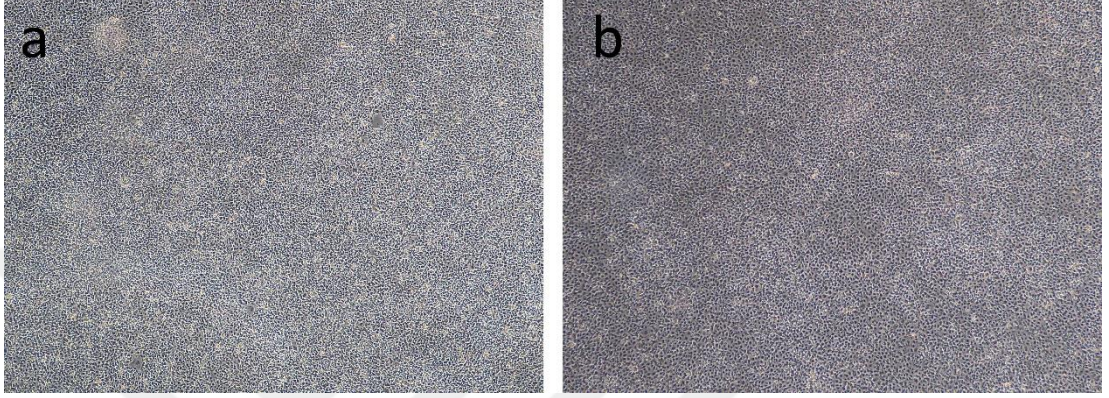
Plazmid kesim işlemi için, hesaplama kolaylığı açısından 90 µl kesim karışımı hazırlandı. Karışım için; 79 µl RNAaz içermeyen steril distile su, 10 µl 10X Cutsmart buffer (NEB, Kat. No:B6004S1, Avusturalya) 1 µl EcoRI HF (High Fidelity) (NEB Kat. No:R3101, Avusturalya) 0,2 ml’lik tüpe eklenerek kesim karışımı hazırlandı. Bu karışımdan 9 µl, plazmid DNA’sından 1 µl alınarak yeni 0,2 ml’lik tüpte karıştırıldı ve 37°C’de 15 dakika kesim işlemi gerçekleştirildi. Tüp içeriği agaroz jel kuyucuğuna yüklenerek yatay elektroforezde 90 voltta 40 dakika yürütüldü ve transilluminator cihazında UV ışık altında görüntülendi.

3.2.8. Genom Dizileme ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması

Bu tez çalışmasında elde edilen pozitif örneğin RNA1 ve RNA2 segmentlerinin kısmi genom dizilimi, VNNV’nin dört genotipi arasındaki yerini belirlemek amacı ile genbanktaki benzer ve referans genotip dizilimleri kullanılarak karşılaştırıldı. Çoklu dizi hizalaması, ClustalW algoritması ile MEGA 11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis-MEGA) programı kullanarak gerçekleştirildi. Daha sonra konsensus verisi ve genbank dizileri için en iyi DNA/Protein modeli olarak Tamura-3 gama distributed (TN93+G) metodu belirlendi ve filogenetik ağaç, MEGA11 programında 1000 tekrarlı bootstrap ile Neighbor-Joining (NJ) yöntemi kullanılarak oluşturuldu. Elde edilen verilerle genbank ve referans verilerinin nükleotid (nt) ve protein farklılıkları incelendi.

3.2.9. Hücre Kültürü ve Virus İzolasyonu

25 cm² 'lik flasklarda temin edilen E-11 ve SSN-1 hücre kültürleri, flask tabanını kapladıktan sonra %5 FBS, %1 antibiyotik içeren L-15 besiyeri ile bir flasktan üç flask olacak şekilde subkültüre edilerek 25°C'ye ayarlanmış inkübatörlerde devamlılığı sağlandı. Virus ekimi planlanan flask subkültüre edilerek yaklaşık 24 saat sonra hücre tabanının %80-90'ını kaplaması beklendi.



Şekil 3.6. Virus inokulasyonuna hazır SSN-1(a) ve E-11(b) hücre kültürünün ters mikroskop görüntüsü (40x)

PCR sonuçlarında pozitif bulunan örnek homojenatından hazırlanan süpernantant, 0,2 µm por çapındaki filtrelerden süzülerek steril hale getirildi. Steril süpernatant 1/100 oranında dilüe edilerek, 25 cm² hücre flaskında hazır olan iki hücre hattına (SSN-1/ E-11) flasktaki medium hacminin %10'u kadar olacak şekilde inokule edildi. Adsorbsiyonlu ve adsorbsiyonsuz yöntemle ekim yapıldı. Adsorbsiyonlu ekimde hücre flaskı 25°C'lik etüvde bir saat adsorbsiyona bırakıldı. Adsorbsiyon tamamlandıktan sonra flaslara %1 FBS içeren L-15 besi yerinden 5 ml eklendi ve 10 gün süre ile 25°C'lik etüvlerde inkübasyona bırakıldı. Virus inokulasyonu yapılan hücre flaslara 10 gün boyunca ters mikroskopta sitopatik etki (CPE) yönünden incelendi.

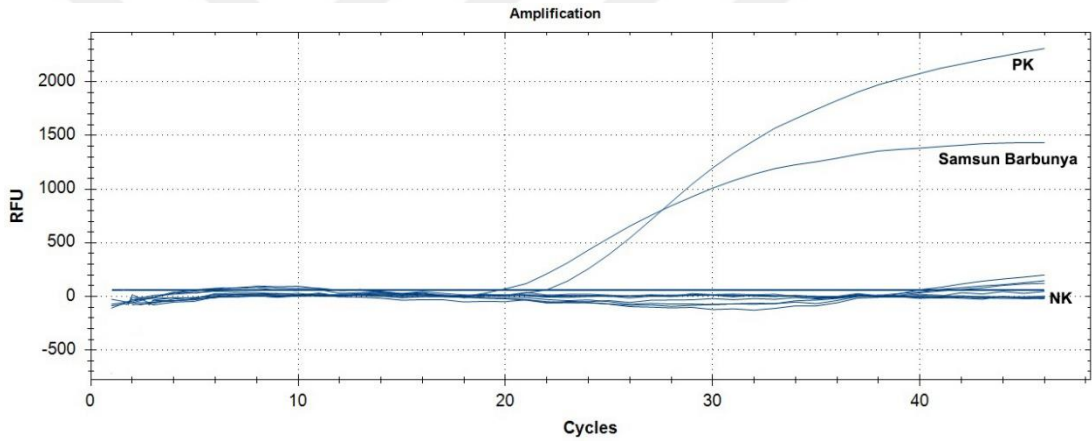
4. BULGULAR

4.1. Nekropsi Bulguları

Tez çalışması boyunca marketler, semt pazarları ve balık hallerinden toplanan balıklarda laboratuvar çalışmaları sırasında, VNN hastalığına ilişkin herhangi bir klinik semptoma rastlanmadı.

4.2. Real Time RT-PCR Sonuçları

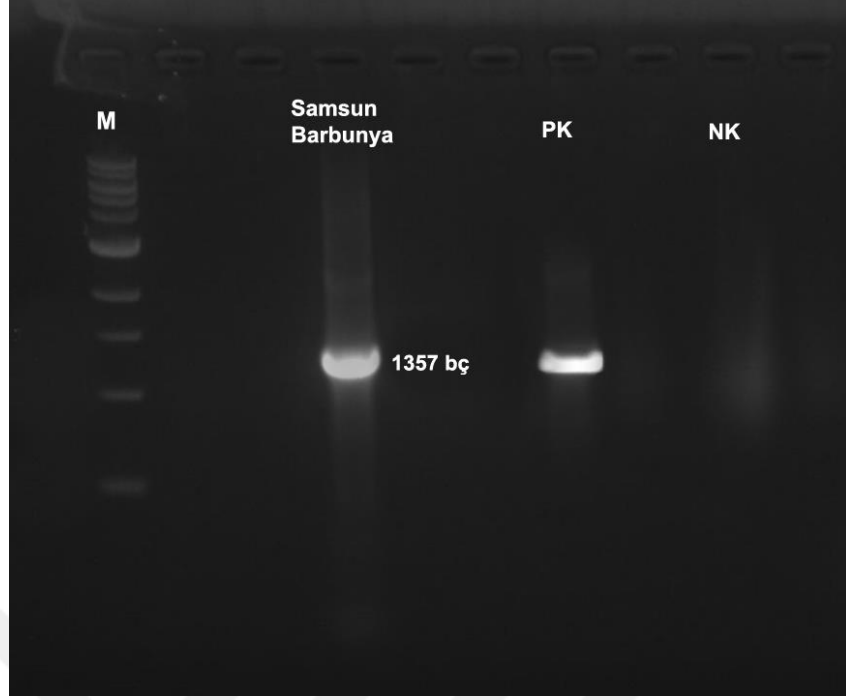
Toplanan örneklerden hazırlanan homojenatlardan RNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra rtRT-PCR işlemi, Tablo 3.6'da belirtilen karışımla ve bahsi geçen ısıl koşullarda tamamlanmasının ardından Şekil 4.1'de ki grafik elde edilmiştir. Grafiğe göre, Samsun ilinden toplanan Barbunya (*Mullus barbatus*) balıklarından oluşturulan üçüncü havuzda, VNN yönünden viral yük barındıran bir örnek görülmüştür.



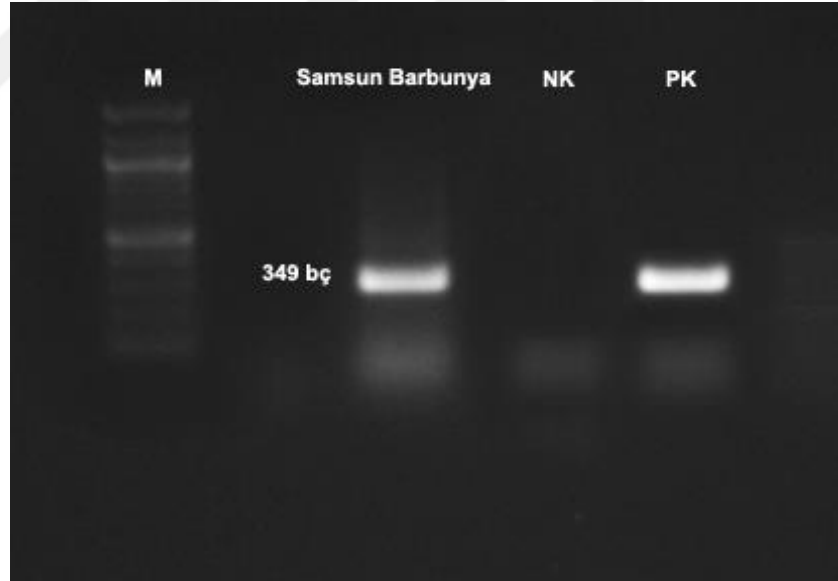
Şekil 4.1. rtRT-PCR sonucu pozitif olarak tespit edilen örnek görüntüsü (PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol)

4.3. Konvansiyonel PCR Sonuçları

Real Time RT-PCR grafiğinde pozitif bulunan örnek konvansiyonel PCR reaksiyonuyla da görüntülenmiştir. Örnek RNA'sı Tablo 3.6'da belirtilen karışımla, Tablo 3.4'te bulunan RNA1 ve RNA2 primerleriyle ve bahsi geçen ısıl koşullarda ayrı ayrı tamamlanmasının ardından yatay elektroforezde agaroz jelde yürütüldü ve PCR ürünlerinin UV ışık altında oluşturduğu bantlar görüntülendi.



Şekil 4.2. Samsun Barbunya örneğinin 1357 baz çifti (bç) uzunluğundaki RNA1 bant görüntüsü (M: 1000 bç'lik DNA Ladder)



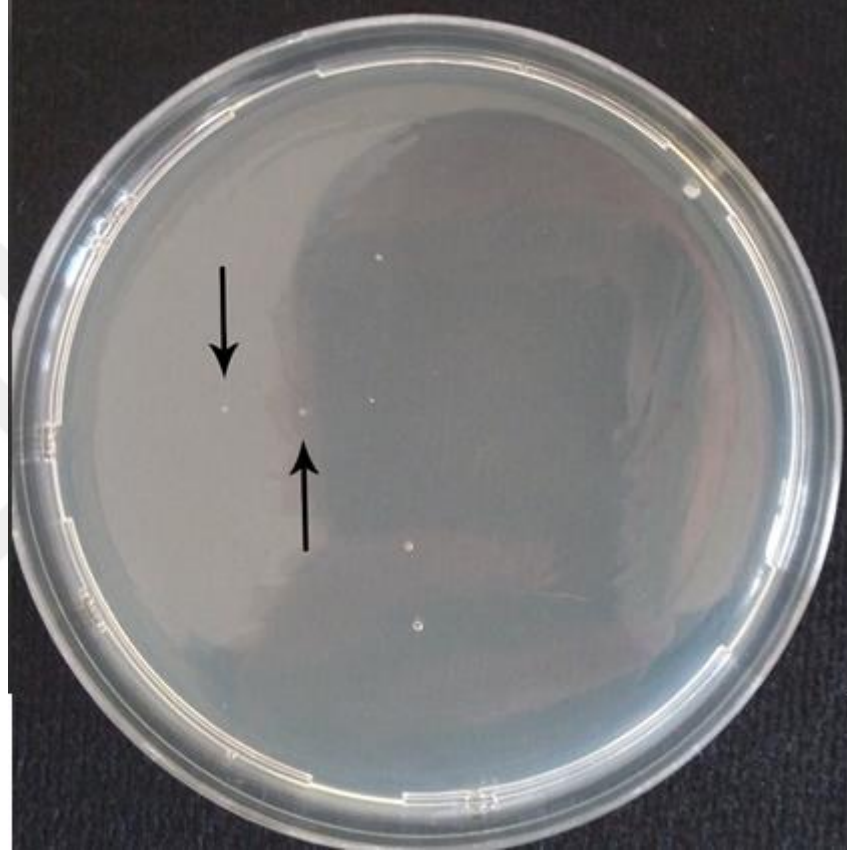
Şekil 4.3. Samsun Barbunya örneğinin 349 baz çifti (bç) uzunluğundaki RNA2 bant görüntüsü (M: 100 bç'lik DNA Ladder)

4.4. Plazmid Klonlama Sonuçları

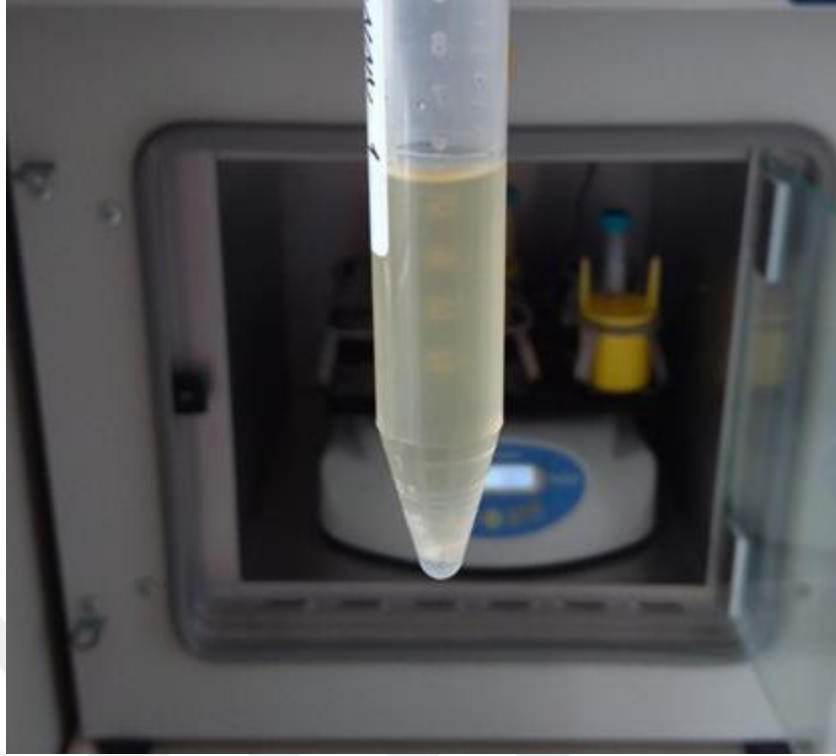
Pozitif bulunan örneğin RNA 2 segmenti PGEM-t Easy vektörüne sorunsuz bir şekilde klonlandı. PCR ürününün vektöre bağlanması ve vektörün *E.coli* JM109 hücresinden saflaştırılmasının ardından *EcoRI* kesim enzimleri ile kesilerek

doğrulaması yapıldı. Elde edilen plazmid sekans çalışmaları ve pozitif örnek olarak sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edildi.

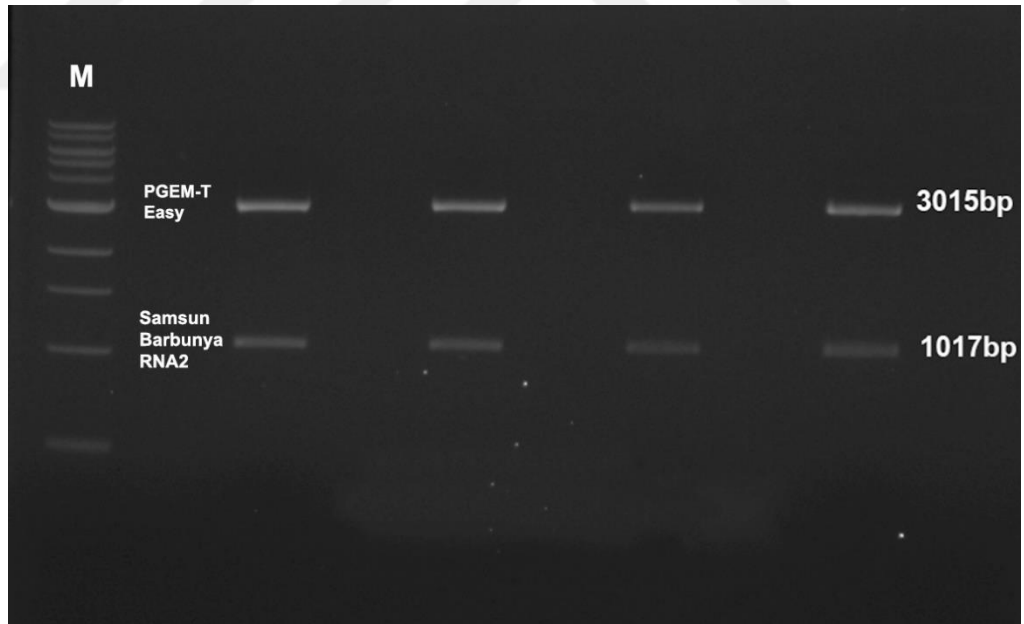
Transformasyon işleminden sonra LB agar üzerine yayılan *E.coli* hücreleri bir gece inkübe edildikten sonra koloniler görüldü. Koloniler sıvı besiyerine alındıktan ve yine bir gece inkübe edildikten sonra, bakteri üreyen tüplerde bulanıklık gözlemlendi.



Şekil 4.4. Transformasyon işlemi sonrası sıvı besiyerinden LB agara aktarılan ve inkübe edilen *E.coli* JM109 kolonileri



Şekil 4.5. LB agardan alınan ve sıvı besiyerinde inkübe edilen kolonilerin oluşturduğu bulanık görüntü



Şekil 4.6. Seçilen dört koloniden pürifiye edildikten sonra kesim enzimiyle kesilerek agar jelde yürütülen plazmidin ve örnek RNA'sının jel görüntüsü (M: 1000 bp'lik DNA Ladder)

4.5. Genom Dizileme ve Filogenetik Analiz Sonuçları

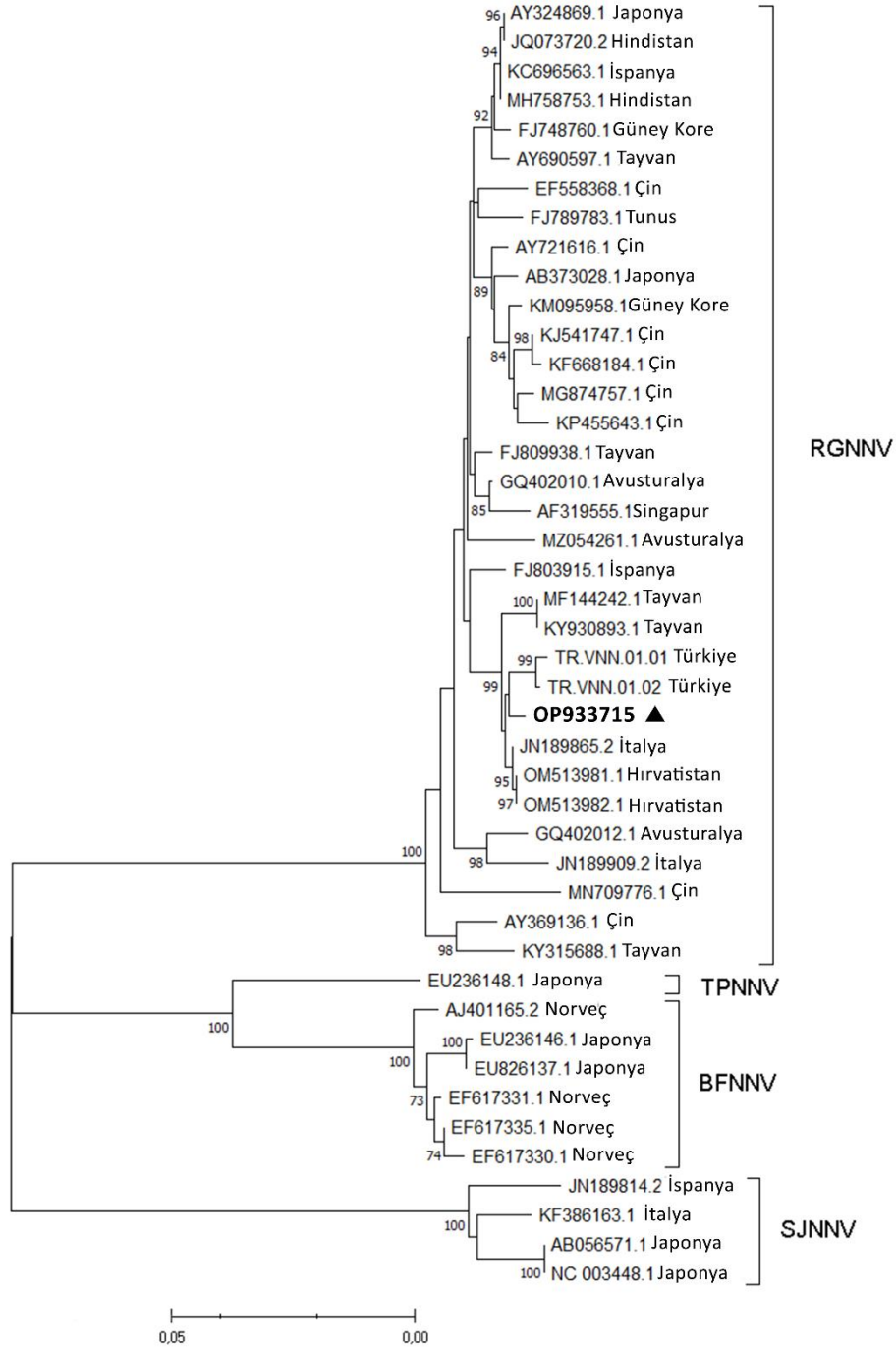
Pozitif örnek verilerinin düzenlemesi MEGA11 programı kullanılarak yapıldı ve elde edilen konsensus verisi NCBI BLAST kullanılarak genbankta bildirimi yapılmış olan veriler ile benzerlikleri belirlendi. Pozitif bulunan örneğin hangi genotip

içerisinde yer aldığı belirlenebilmesi için RT-PCR işleminde kullanılan primerler kullanılarak, sanger sekanslama metodu ile dizileme işlemi gerçekleştirildi ve elde edilen dizilerle filogenetik ağaçları oluşturuldu. Pozitif örneğin RNA1 segmenti için, VNNV'nin protein A'sını kodlayan geninin içerisinde yer alan 1213 bç'lik (1634-2848) kısmi nükleotid dizilimi belirlendi. Örneğin RNA2 segmenti, VNNV'nin kapsid proteinini kodlayan geninin içerisinde yer alan 930 bç 'lik (78-1009) kısmi nükleotid dizilimi belirlendi. RNA1 segmenti filogenetik ağacının oluşturulmasında, dünyanın çeşitli yerlerinden bildirilen, genbanktan alınan ve henüz genbankta yer almayan ancak tez merkezinde bulunan Murat Kaplan'ın (2020) 618068 numaralı tezinde mevcut iki adet Türkiye izolatlarıyla birlikte 42, RNA2 segmentinin filogenetik ağacının oluşturulmasında, Türkiye izolatları ve genbank verileri ile birlikte 57 tam sekans dizilimi kullanılmıştır. Örneğin genbank verileriyle çoklu hizalaması yapıldıktan sonra hizalama dışındaki uçlar kesilerek değerlendirilme yapılmıştır.

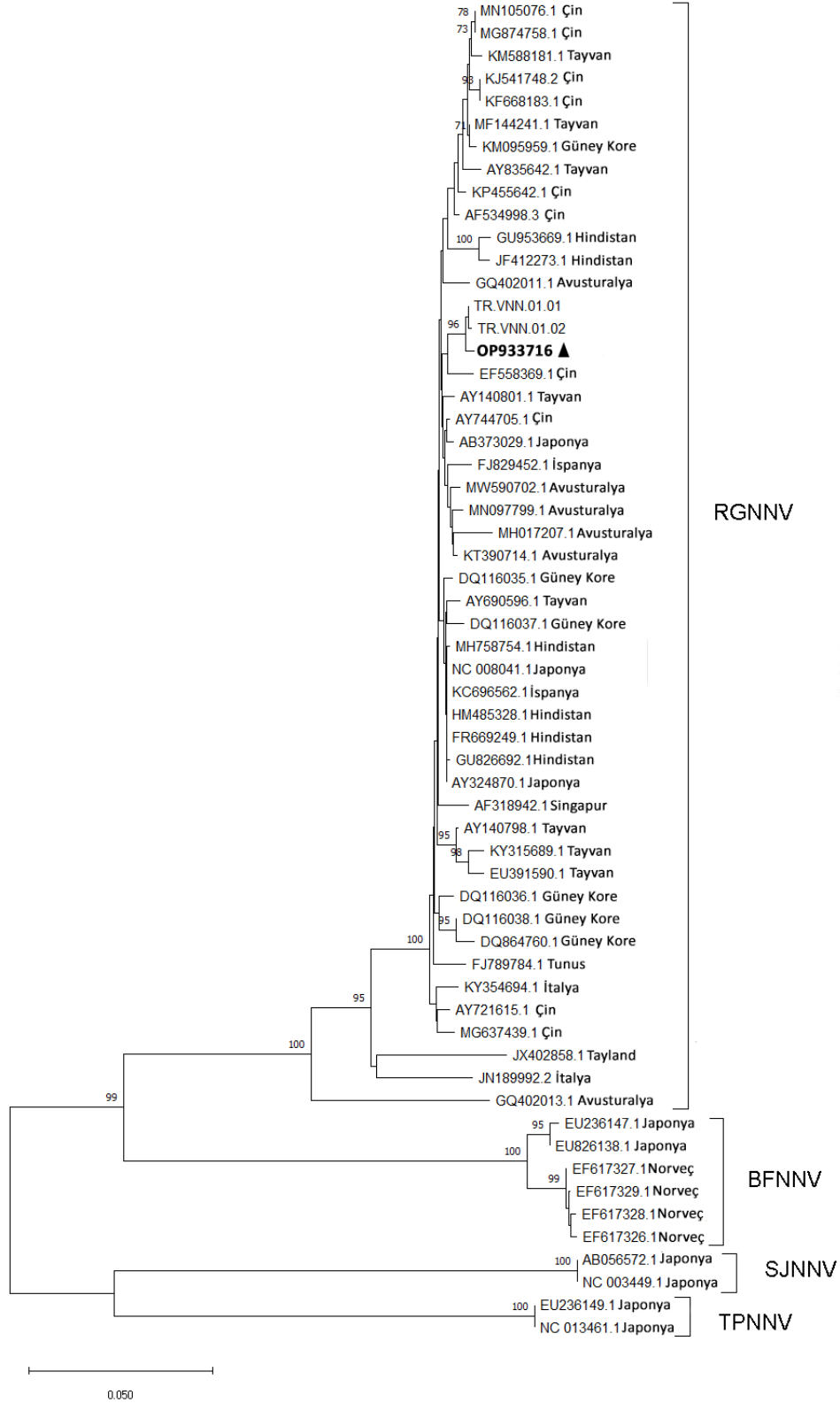
Tez çalışması örneğinin RNA1 kısmi sekans analizi sonucu, segmentin RGNNV genotipini içerisinde yer aldığı görülmüştür. Yapılan BLAST işlemi sonucunda, %99,52 Türkiye'de levrekten elde edilen (TR.VNN.01.02) %99,42 oranında Romanya'dan alınan levrekten (JN189865.2), %99,34 oranında Hırvatistan'da levrekten (OM513982.1 - OM513981.1), %98,93 oranında Türkiye'de levrekten (TR.VNN.01.02) %98,68 oranında Tayvan'da turuncu benekli orfozdan (MF144242.1 - KY930893.1), %98,02 oranında İspanya'da levrekten (FJ803915.1) ve %97,86 oranında Tayvan'da turuncu benekli orfozdan elde edilen (FJ809938.1) betanodavirus dizilerine benzerlik gösterdiği belirlendi.

Tez çalışması örneğinin RNA2 kısmi sekans analizi sonucunda RGNNV genotipi içerisinde yer aldığı ve virusta bir segment değişiminin gerçekleşmediği görülmüştür. RNA2 sekans verisi BLAST işlemi yapıldığında, %99,78 ve %99,57 oranında Türkiye'de levrekten elde edilen (TR.VNN.01.01, TR.VNN.01.02), %99,25 oranında Çin'de kırmızı benekli orfozdan (AY744705.1), %99,14 oranında Japonya'da yedi şeritli orfozdan (AB373029.1), %99,03 oranında Avusturalya'da dev orfozdan (KT390714.1), %99,03 oranında Avusturalya'da dağ alabalığından (MN097799.1), %98,92 oranında İspanya'da kalkan balığından elde edilen (KC696562.1) betanodavirus dizilerine benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Tez örnekleri TR.VNN.Samsun.01 olarak isimlendirilmiştir. Genbanka yüklenmiş ve RNA1 segmenti OP933715, RNA2 segmenti OP933716 olarak numarandırılmıştır.



Şekil 4.7. Elde edilen pozitif örneğin 1216 bç uzunluğundaki RNA1 kısmi sekansı ve genbank veri ile oluşturulan filogenetik ağaç. Ağaç oluşturulurken DNA/Protein modeli olarak Tamura-3 gama distrubuted (TN93+G) metodu, 1000 tekrarlı bootstrap ile Neighbor-Joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. 70 ve üzeri bootstrap değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Elde edilen pozitif örneğin 930 bp uzunluğundaki RNA2 kısmi sekansı ve genbank veri ile oluşturulan filogenetik ağaç. Ağaç oluşturulurken DNA/Protein modeli olarak Tamura-3 gamma distributed (TN93+G) metodu, 1000 tekrarlı bootstrap ile Neighbor-Joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. 70 ve üzeri bootstrap değerleri gösterilmiştir.

Tez örneğinin 1216 bp uzunluğundaki RNA1 segmentinin yakın olduğu diğer verilerle olan nükleotid farklılıkları incelendiğinde; 1692 (C→T), 1893 (C→T), 1896 (T→C), 2028 (C→T) ve 2196 (C→A), 2319 (G→A), 2427 (T→C), 2622 (T→C) olmak üzere 8 nükleotid pozisyonunda baz farklılığı gözlemlendi. Tez örneğinin 930 bp uzunluğundaki RNA2 segmenti aynı şekilde nükleotid farklılığı açısından incelendiğinde; 269 (C→T), 293 (G→A), 503 (A→G), 506 (T→C), 590 (C→T), 792 (G→A), 818 (C→T), 1007 (T→G) olmak üzere 8 nükleotid pozisyonunda baz farklılığı gözlemlendi.

982 amino asit (aa) uzunluğunda RNA bağımlı RNA polimeraz (RDRP-Protein A) proteini kodlayan RNA1 segmenti ile tez çalışmasındaki örneğin kısmi sekansının kodladığı amino asitler hizalanarak farklılıkları incelendi. Referans verilerle 405 aa'lık (520 – 925) bölgeyi kodlayan örnek RNA1 kısmi sekansı arasında bir aa değişikliğine rastlanmadı.

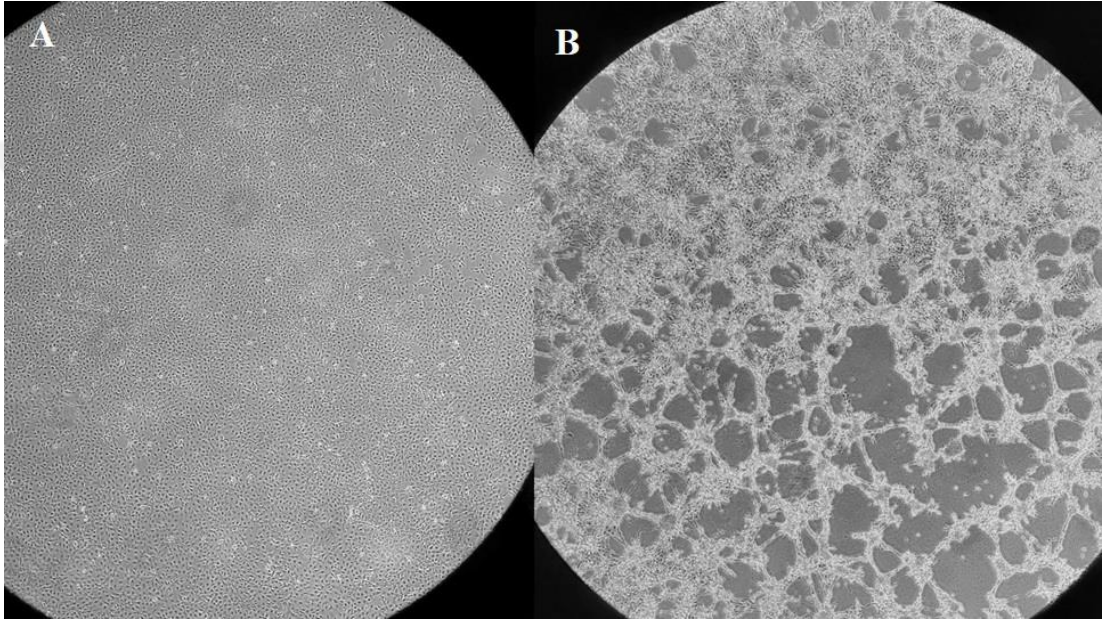
338 aa uzunluğundaki kapsid proteinini kodlayan RNA2 segmenti ile tez çalışmasındaki örneğin kısmi sekansının kodladığı amino asitler hizalanarak farklılıkları incelendi. Referans verilerle 311 aa uzunluğundaki (17 - 327) bölgeyi kodlayan örnek RNA2 kısmi sekansı arasında 256. aa pozisyonunda farklılık gözlemlendi. Referans verilerde 256. aa pozisyonunda valin yer alırken, tez örneğinde izolöysin olarak değiştiği görüldü. Değişiklik Şekil 4.9 'da sarı şerit içerisinde gösterilmiştir.

Name	K	S	I	L	L	G	S	T	P	L	D	I	A	P	D	G	A	I	F	Q	L	D	R	P	L	S	I	D	Y	S	L	G	T	G	
1. VNN.TR.Samsun.01	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2. TR.VNN.01.01	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3. TR.VNN.01.02	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4. FJ829452.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5. EF558369.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6. AY744705.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7. AB373029.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8. KT390714.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9. MN097799.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
10. KC696562.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11. HM485328.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12. FR669249.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
13. AY324870.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14. MH758754.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15. NC 008041.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16. MW590702.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17. FJ789784.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18. KY315689.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
19. GQ402011.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
20. MN105076.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
21. EF558369.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Şekil 4.9. Tez örneği ve referans verilerin RNA2 segmentinin kodladığı kapsid proteininin 256. aa pozisyonundaki valin-izolöysin değişikliği.

4.6. Virus İzolasyonu

rtRT-PCR’da pozitif tespit edilen örnek 1/100 oranında dilüe edildi. Adsorbsiyonlu inokulasyonda hücrenin flask yüzeyinden kalktığı görüldüğü için SSN-1 ve E-11 hücre hattına adsorbsiyonsuz inokulasyonu yapıldı. 25°C’de 10 gün CPE yönünden incelendi. SSN-1 hücre hattı stabil tutulamadığı için sağlıklı değerlendirilemedi. İlk pasajın 9. gününde E-11 hücre hattında CPE olduğu düşünülen etkiler görüldü ancak rtRT-PCR testinde doğrulanamadı. İki deneme olmak üzere farklı zamanlarda beşer kez kör pasaj yapılan virustan pozitif sonuç alınamadı.



Şekil 4.10. Virus inokulasyonu öncesi E-11 hücre hattı (A) ve inokulasyondan 9 gün sonra E-11 hücre hattının (B) ters mikroskop görüntüsü (40x)

5. TARTIŞMA

Dünyada balık üretimi endüstrisinde viral enfeksiyonlar, kontrolü ve tedavisinin zor olmasından dolayı ciddi salgınlara, ticari ve ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Viral balık hastalıkları arasında VNN, ilk kez görüldüğü 1985'ten bugüne Güney Amerika hariç dünyanın birçok yerinde bildirilen, özellikle larval dönemdeki balıklarda %100'e varan mortalite oranıyla çiftlikler ve vahşi balıklar için önemli olan viral bir patojendir (Costa and Thompson, 2016). VNN'in önemi özellikle Akdeniz havzasındaki levrek ve çipura üretim çiftlikleri tarafından bilinmektedir ve zaman zaman Avrupa'daki çeşitli sağlık enstitüleri, üniversiteler ve araştırma merkezleri projeleri kapsamında sürveyans çalışmaları yapılmaktadır (Padrós et al., 2022). Hastalık Akdeniz'de endemiktir ve daha önce kültür balıkçılığında ve vahşi balıklarda birçok kez bildirilmiştir (Toffan et al., 2017; Berzak et al., 2019). VNNV'nin RGNNV, SJNNV, BFNNV ve TPNNV olmak üzere dört farklı genotipi vardır. Virusun patojenitesi, etkilediği balık türü çeşitliliği ve aktif olduğu optimum su sıcaklığı, genotipe göre değişiklik göstermektedir. Temelde dört genotip olmasına rağmen virusun segmentli yapısından dolayı, RGNNV/SJNNV ve SJNNV/RGNNV reassortant virusları da bildirilmiştir (Cutrín et al., 2007; Toffolo et al., 2007; Oliveira et al., 2009; Panzarín et al., 2012). Dünya genelinde bildirimi yapılan ve birçok türde enfeksiyon oluşturan en yaygın genotip RGNNV'dir. Özellikle yaz aylarında ortalama deniz suyu sıcaklığının yaklaşık 26 °C olduğu Akdeniz Havzasıyla birlikte, Asya kıyılarında ve Avusturalya'da kültür ve vahşi balıklarda RGNNV genotipi, büyük kayıplara neden olmaktadır (Ciulli et al., 2007; Moody et al., 2009; Nishioka et al., 2016). BFNNV sadece soğuk suda yaşayan bazı balık türlerinde görülürken, TPNNV bir türde görülmüştür (Munday et al., 2002). SJNNV genotipinin uzun yıllar Japon sularındaki bazı türlerde enfeksiyon oluşturduğu düşünülürken (Nishizawa et al., 1997; Munday et al., 2002), İber Yarımadası'ndaki levrek, çipura ve *Solea senegalensis* türü balıklarda da bildirimi yapılmıştır (Thiery et al., 2004; Cutrín et al., 2007). Dünya çapında balık ticaretinin, virusun yeni çevresel koşullara uyum sağlamasında ve yeni konakçılar oluşturmaya katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

VNNV Türkiye'de ve dünyada ihbarı mecburi hastalıklar listesinde yer almadığı için epidemiyolojik verilerin oluşturulmasında yapılan çalışmalar kullanılmaktadır. Dünyada, tez çalışması örneklemede de esas alınan, vahşi balıklarda yapılan VNN bildirim sayılarına bakıldığında yaklaşık %89 oranla RGNNV genotipinin bildirildiği

görülmektedir. Daha sonra yaklaşık %7 SJNNV ve %4 BFNNV genotipi bildirilmiştir (Bandín and Souto, 2020).

Türkiye’de VNN bildirimi, ilk kez Mersin ilinde kayıplar yaşanan levrek çiftliğinden alınan örneklerden yapılmıştır ve virus RGNNV olarak genotiplendirilmiştir (Özyer vd., 2014). Daha sonra Kaplan vd. (2021) 2016 yılında Karadeniz’de yaptıkları çalışmada, çiftliklerden aldıkları levrek örneklerinde RGNNV genotipi VNN virusu tespit etmişlerdir. Kaplan ve Karaoğlu (2021) 2016-2017 yıllarında Türkiye’deki levrek çiftliklerinden aldıkları örneklerden VNNV teşhis ederek virusun RGNNV genotipine ait olduğunu bildirmişlerdir. Son olarak Kaplan et al. (2022) 2019 yılında Ege Denizi’nde yer alan çipura çiftliklerinden aldıkları örneklerde virus tespit etmiş ve ilk kez Türkiye sularında RGNNV/SJNNV reassortant virusunun bildirimini yapmıştır.

Türkiye’de VNNV ile ilgili Karadeniz’de avlanan balıklarda bir bildirim yapılmamıştır. VNNV’nin Akdeniz’de endemik olduğu bilinse de farklı su sıcaklıklarında enfektif olan genotiplerinin varlığı Karadeniz’de bulunan balık popülasyonu için tehdit oluşturmaktadır. Yapılan tez çalışması, VNNV’nin Türkiye’de yabani hayattaki epidemiyolojisi hakkında yapılan ilk çalışma olması, elde edilen virusun genetik yapısıyla dünyadaki VNN virusları arasındaki farklılıklarının ortaya konulması, hastalığa dikkat çekilip potansiyel tehlikesinin fark edilerek, oluşabilecek salgınlara karşı ve koruma kontrol yaklaşımının belirlenmesi yönünden önem taşımaktadır.

Tez çalışmasının örnekleme aşamasında, her bir balık türü için %95 güven aralığı, %5 hata payı ve %10 tahmini prevalansta, her ilden 30 adet balık örneği toplanmıştır. Alabalık türüne çalışma sırasında karar verilmesiyle bir ilden 30 adet alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Örnekler 2019-2020 yıllarında avlanma sezonunda avlanan yetişkin boy balıklardan yapılmıştır ve toplam 1265 adet balık örneği toplanmıştır.

Toplanan balıklardan alınan göz ve beyin dokularından, Tablo 3.3 ve Tablo 3.4’te belirtilen primerle yapılan RT-PCR ve rtRT-PCR testleri sonucunda, Samsun ilinden alınan barbunya balığı havuzunda VNN pozitifliği bulunmuş ve yapılan sekans çalışmasında örneğin iki segmentinin de RGNNV genotipi olduğu görülmüştür. Elde edilen örneğin RNA1 segmenti sekansı BLAST işleminde %99,52 Türkiye, %99,42 oranında Romanya, %99,34 oranında Hırvatistan, %98,93 oranında Türkiye, RNA2 segmenti sekansı ise %99,78 ve %99,57 oranında Türkiye, %99,25 oranında Çin,

%99,14 oranında Japonya, %99,03 oranında Avusturalya'da bildirilen sekans verileriyle benzer bulunmuştur. Nükleotid benzerlikleri değerlendirildiğinde RNA1 segmenti Akdeniz Havzası izolatlarıyla yakın olmakla birlikte, RNA2 segmenti uzak doğu verileriyle yüksek benzerlik göstermiştir.

RdRp enzimini kodlayan RNA1 segmentinde özellikle 1-445. aa pozisyonlarında değişikliğe sebep olacak mutasyonların, virusun replike olabildiği optimum sıcaklığı etkilediği bildirilmiştir (Hata et al., 2010; Panzarin et al., 2014). Tez çalışmasında bulunan virusun RNA1 segmentinde, referans verilere göre 8 nükleotid değişimi görülmektedir. Ancak bir aa değişikliği gözlenmemiştir. Buna rağmen elde edilen virusun Karadeniz'de bulunması, bu nt değişimlerinin su sıcaklığına uyum sürecinde oluşan nokta mutasyonlar olabileceğini düşündürmüştür.

RNA2 segmentinin konakçı spektrumu ve antijenik reaktivitede rol oynadığı gösterilmiştir (Iwamoto et al., 2004; Panzarin et al., 2016). Panzarin et al. (2016) RGNNV genotipi için konakçı spektrumunda etkili bölgenin 694-758. nt aralığı, antijenik reaktivitede etkili bölgenin 675-795. nt aralığı olduğu bildirilmiştir. Souto et al. (2015) ise 247. ve 270. aa pozisyonlarının antijenik reaktivitede etkili olduğunu göstermiştir. Tez çalışmasında bulunan virusun RNA2 segmenti referans verilerle karşılaştırıldığında, 8 nt değişimi görülmüştür. Bu değişimlerden ORF içerisinde 766.nt mutasyonu (G→A) 256. aa pozisyonunda valin-izolöysin değişikliğine yol açmıştır. Oluşan değişik, Kaplan ve Karaoğlu'nun (2021), Ege ve Akdeniz'de bildirdiği VNNV izolatlarında meydana gelen aa değişikliğiyle aynı olduğu görülmüştür. Daha önce bildirilen konakçı spektrumu ve antijenik reaktivite alanları göz önüne alındığında, meydana gelen değişikliklerin virusta belirgin bir farklılığa sebep olmayacağı düşünülmektedir.

RGNNV genotipi için optimum su sıcaklığının 25-30°C olduğu bildirilmiştir. Ancak optimum gelişme sıcaklığının 15-20 °C olduğu bilinen BFNNV genotipinin yaygın olduğu iskandinav sularında, RGNNV genotipi ile enfekte balık bildirimi yapılmıştır (Korsnes et al., 2017). Örneklemin yapıldığı avlanma sezonu aylarında (Eylül-Nisan) Karadeniz deniz suyu sıcaklık ortalamasının 13,3 °C olduğu, diğer aylarda da RGNNV genotipi için optimum sıcaklık aralığından düşük olduğu görülmüştür. Bu bulgular yapılan çalışmada tespit edilen virusun viral yükünün düşük olduğu düşüncesini güçlendirmektedir.

VNN horizontal ve vertikal yolla bulaşabilmektedir. Bu yüzden asemptomatik persiste balık örneklerindeki virusu saptamak son derece önem taşımaktadır. Yetişkin

balıklarda virus genellikle asemptomatik ve düşük seviyelerde olduğu için teşhisi zor olmaktadır. VNNV virus izolasyon çalışmalarında SSN-1 ve klonu olan E-11 hücre hattı kullanılmasının uygun olduğu bildirilmiştir. SSN-1 hücre hattının virusa karşı daha duyarlı olduğu ancak nonspesifik CPE oluşturmamasından dolayı yanıltıcı sonuç verebildiği çalışmalarda gösterilmiştir (Iwamoto et al., 2000). Yapılan tez çalışmasında, alınan göz ve beyin örneği homojenatından E-11 ve SSN-1 hücre kültürlerinde kör pasaj işlemi tekrarlı olarak yapılmıştır. Yapılan ilk pasajdan sonra özellikle E-11 hücre hattının, literatüre uygun olarak ekimden dokuz gün sonra formunun değiştiği gözlenmiştir. Ancak hücre kültürlerinden alınan örneklerden yapılan RT-PCR testlerinde pozitif sonuç bulunamamıştır. Beş kez yapılan adsorbsiyonsuz kör pasaj sonucu virus aktif hale gelmemiştir ve virus izolasyon çalışması başarısız sonuçlanmıştır. Bunun nedeninin, toplanan örneklerin klinik semptom göstermeyen yetişkin balıklar olmasından dolayı, enfektif viral partikül yükünün düşük kalarak virusun hücre kültüründe replike olamadığı düşünülmektedir. Hücre hattında görülen değişikliğin nedeninin, subkültür işleminde kullanılan sıvı besiyeri, serum veya tripsin etkenlerinden kaynaklandığı sanılmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

VNNV tüm dünyada olduğu gibi Türkiye için de önemli tehdit oluşturmaktadır. Virusun geniş konakçı spektrumu ve farklı su sıcaklıklarında aktif kalabildiği bilinmektedir. Virusun Akdeniz için endemik olduğu bildirilmiş ancak Karadeniz’de avlanan balıklarla ilgili bir çalışma yapılmamıştır.

Yapılan tez çalışmasıyla virusun Türkiye’deki yabani hayatta ilk kez varlığı ortaya konmuş, RNA1 ve RNA2 segment dizilimi yapılmış ve dünya izolatlarıyla benzerlikleri karşılaştırılmıştır.

VNNV’nin Karadeniz’deki varlığının, virusun uzun süre persiste kalabildiği, horizontal ve vertikal yolla bulaşabildiği düşünüldüğünde, deniz suyunda üretimi yapılan balıklar ve özellikle VNNV’ye karşı duyarlı olduğu bilinen levrek balığı işletmeleri için büyük tehdit unsuru olabileceği düşünülmektedir. Bunun için özellikle işletmelerin biyogüvenlik önlemlerini almaları gerekmektedir.

İleride oluşabilecek salgınlar ve ekonomik kayıpları önlemek için, şimdiden kurumlarca gerekli koruma ve kontrol stratejileri belirlenmeli ve uygulanmalıdır.

Su sıcaklığının fazla olduğu yaz aylarında larva ve frylardan örnekleme yapılarak izolasyon çalışmalarının yapılması, bölgesel genotiplendirmenin netleştirilmesi ve hastalığa yönelik aşı çalışmalarının yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Anonim 2022a <https://viralzone.expasy.org/614> Erişim 28.08.2022

- Arimoto, M., Maruyama, K., & Furusawa, I. (1994). Epizootiology of viral nervous necrosis (VNN) in striped jack. *Fish Pathology*, 29(1), 19-24. <https://doi.org/DOI 10.3147/jsfp.29.19>
- Arimoto, M., Mushiake, K., Mizuta, Y., Nakai, T., Muroge, K., & Furusawa, I. (1992). Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fish Pathology*, 27(4), 191-195. <https://doi.org/DOI 10.3147/jsfp.27.191>
- 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 (SJNNV). *Aquaculture*, 143(1), 15-22. [https://doi.org/Doi 10.1016/0044-8486\(96\)01261-6](https://doi.org/Doi 10.1016/0044-8486(96)01261-6)
- Arslan, G., & Yıldız, P. O. (2021). Türkiye Su Ürünleri Sektörüne Genel Bakış. *Menba Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 7(1), 46-57.
- Azad, I., Jithendran, K., Shekhar, M., Thirunavukkarasu, A., & De la Pena, L. (2006). Immunolocalisation of nervous necrosis virus indicates vertical transmission in hatchery produced Asian sea bass (*Lates calcarifer* Bloch)—A case study. *Aquaculture*, 255(1-4), 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.076>
- Ball, L., Wohlrab, B., & Li, Y. (1994). Nodavirus RNA replication: mechanism and harnessing to vaccinia virus recombinants. In *Positive-Strand RNA Viruses* (pp. 407-416). Springer.
- Bandín, I., & Souto, S. (2020). Betanodavirus and VER disease: a 30-year research review. *Pathogens*, 9(2), 106. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020106>
- Baud, M., Cabon, J., Salomoni, A., Toffan, A., Panzarin, V., & Bigarré, L. (2015). First generic one step real-time Taqman RT-PCR targeting the RNA1 of betanodaviruses. *Journal of virological methods*, 211, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.09.016>
- Bellance, R., & Gallet de Saint-Aurin, D. (1988). L'encephalite virale du loup de mer. *Caribes 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. *Diseases of aquatic organisms*, 133(1), 7-17. <https://doi.org/10.3354/dao03339>
- Binesh, C. (2013a). Genetic characterization of betanodavirus isolates from Asian seabass *Lates calcarifer* (Bloch) in India. *Archives of Virology*, 158(7), 1543-1546. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1554-x>
- Binesh, C. (2013b). Mortality due to viral nervous necrosis in zebrafish *Danio rerio* and goldfish *Carassius auratus*. *Diseases of aquatic organisms*, 104(3), 257-260. <https://doi.org/10.3354/dao02605>
- Bitchava, K., Chassalevris, T., Lampou, E., Athanassopoulou, F., Economou, V., & Dovas, C. I. (2019). Occurrence and molecular characterization of betanodaviruses in fish and invertebrates of the Greek territorial waters. *Journal of Fish Diseases*, 42(12), 1773-1783. <https://doi.org/10.1111/jfd.13098>
- Bloch, B., Gravningen, K., & Larsen, J. L. (1991). Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Dis. aquat. Org.*, 10(1), 65-70. <https://doi.org/DOI 10.3354/dao010065>
- Breuil, G., Bonami, J., Pepin, J., & 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), 109-116. [https://doi.org/Doi 10.1016/0044-8486\(91\)90258-9](https://doi.org/Doi%2010.1016/0044-8486(91)90258-9)
- Breuil, G., Pepin, J., 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. [https://doi.org/DOI 10.1046/j.1365-2761.2002.00406.x](https://doi.org/DOI%2010.1046/j.1365-2761.2002.00406.x)
- Breuil, G., Pepin, J., Castric, J., Fauvel, C., & Thiery, R. (2000). Detection of serum antibodies against nodavirus in wild and farmed adult sea bass: application to the screening of broodstock in sea bass hatcheries. *BULLETIN-EUROPEAN ASSOCIATION OF FISH PATHOLOGISTS*, 20(3), 95-100. <Go to ISI>://WOS:000087895800002
- Buchan, K. A., Martin-Robichaud, D. J., Benfey, T. J., MacKinnon, A.-M., & Boston, L. (2006). The efficacy of ozonated seawater for surface disinfection of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) eggs against piscine nodavirus. *Aquacultural Engineering*, 35(1), 102-107. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.10.001>
- Chen, L.-J., Su, Y.-C., & Hong, J.-R. (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), 444-454. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.048>
- Chen, S.-P., Yang, H.-L., Her, G. M., Lin, H.-Y., Jeng, M.-F., Wu, J.-L., & Hong, J.-R. (2006). Betanodavirus induces phosphatidylserine exposure and loss of mitochondrial membrane potential in secondary necrotic cells, both of which are blocked by bongkrekic acid. *Virology*, 347(2), 379-391. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.052>
- Chen, Y.-M., Shih, C.-H., Liu, H.-C., Wu, C.-L., Lin, C.-C., Wang, H.-C., Chen, T.-Y., Yang, H.-L., & Lin, J. H.-Y. (2011). An oral nervous necrosis virus vaccine using *Vibrio anguillarum* as an expression host provides early protection. *Aquaculture*, 321(1-2), 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.035>
- Chen, Y.-M., Wang, T.-Y., & Chen, T.-Y. (2014). Immunity to betanodavirus infections of marine fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 43(2), 174-183. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.07.019>
- Chi, S., Hu, W., & Lo, B. (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). *Journal of Fish Diseases*, 22(3), 173-182. [https://doi.org/DOI 10.1046/j.1365-2761.1999.00152.x](https://doi.org/DOI%2010.1046/j.1365-2761.1999.00152.x)
- Chi, S., Lo, C., Kou, G., Chang, P., Peng, S., & Chen, S. (1997). Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 20(3), 185-193.
- Chi, S., Shieh, J., & Lin, S. (2003). Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Diseases of aquatic organisms*, 55(3), 221-228. <https://doi.org/10.3354/dao055221>
- Ciulli, S., Gallardi, D., Scagliarini, A., Battilani, M., Hedrick, R., & Prosperi, S. (2006). Temperature-dependency of Betanodavirus infection in SSN-1 cell line. *Diseases of aquatic organisms*, 68(3), 261-265. <https://doi.org/10.3354/dao068261>
- Ciulli, S., Galletti, E., Grodzki, M., Alessi, A., Battilani, M., & Prosperi, S. (2007). Isolation and genetic characterization of Betanodavirus from wild marine fish from the Adriatic Sea. *Veterinary research communications*, 31(1), 221-224. <https://doi.org/10.1007/s11259-007-0010-y>
- Comps, M., Pepin, J., & Bonami, J. (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, J.-C. (1996). Virus-like particles in the retina of the seabram, *Sparus aurata*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 16(5), 161-163.
- Costa, J. Z., & Thompson, K. D. (2016). Understanding the interaction between Betanodavirus and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy. *Fish & shellfish immunology*, 53, 35-49. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.033>
- Curtis, P., Drawbridge, M., Iwamoto, T., Nakai, T., Hedrick, R., & Gendron, A. (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), 263-271. <https://doi.org/DOI 10.1046/j.1365-2761.2001.00292.x>
- Cutrín, J., Dopazo, C., Thiéry, R., Leao, P., Oliveira, J., Barja, J., & 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), 225-232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00803.x>
- 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. *Veterinary microbiology*, 110(3-4), 167-179. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.07.014>
- Dannevig, B., Nilsen, R., Modahl, I., Jankowska, M., Taksdal, T., & Press, C. M. (2000). Isolation in cell culture of nodavirus from farmed Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* in Norway. *Diseases of aquatic organisms*, 43(3), 183-189. <https://doi.org/10.3354/dao043183>
- Delsert, C., Morin, N., & Comps, M. (1997). A fish encephalitis virus that differs from other nodaviruses by its capsid protein processing. *Archives of Virology*, 142(12), 2359-2371. <https://doi.org/DOI 10.1007/s007050050248>
- Doan, Q., Vandeputte, M., Chatain, B., Morin, T., & Allal, F. (2017). Viral encephalopathy and retinopathy in aquaculture: a review. *Journal of Fish Diseases*, 40(5), 717-742. <https://doi.org/10.1111/jfd.12541>
- Fenner, B., Du, Q., Goh, W., Thiagarajan, R., Chua, H., & Kwang, J. (2006). Detection of betanodavirus in juvenile barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), by antigen capture ELISA. *Journal of Fish Diseases*, 29(7), 423-432. <https://doi.org/DOI 10.1111/j.1365-2761.2006.00736.x>
- Fenner, B. J., Thiagarajan, R., Chua, H. K., & Kwang, J. (2006). Betanodavirus B2 is an RNA interference antagonist that facilitates intracellular viral RNA accumulation. *Journal of Virology*, 80(1), 85-94. <https://doi.org/10.1128/Jvi.80.1.85-94.2006>
- Frerichs, G., Morgan, D., Hart, D., Skerrow, C., Roberts, R., & Onions, D. (1991). Spontaneously productive C-type retrovirus infection of fish cell lines. *Journal of General Virology*, 72(10), 2537-2539. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-10-2537>
- Frerichs, G., Rodger, H., & Peric, Z. (1996). Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Journal of General Virology*, 77(9), 2067-2071. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-9-2067>
- Frerichs, G., Tweedie, A., Starkey, W., & Richards, R. (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. [https://doi.org/Doi 10.1016/S0044-8486\(99\)00337-3](https://doi.org/Doi 10.1016/S0044-8486(99)00337-3)
- Glazebrook, J., Heasman, M., & De Beer, S. (1990). Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Journal of Fish Diseases*, 13(3), 245-249. <https://doi.org/DOI 10.1111/j.1365-2761.1990.tb00780.x>

- Gomez-Casado, E., Estepa, A., & Coll, J. (2011). A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. *Vaccine*, 29(15), 2657-2671.
- Gomez, D. K., Baeck, G. W., Kim, J. H., Choresca Jr, C. H., & Park, S. C. (2008). Molecular detection of betanodaviruses from apparently healthy wild marine invertebrates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97(3), 197-202. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.10.012>
- Gomez, D. K., Mori, K.-i., Okinaka, Y., Nakai, T., & Park, S. C. (2010). Trash fish can be a source of betanodaviruses for cultured marine fish. *Aquaculture*, 302(3-4), 158-163. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.033>
- Grotmol, S., Bergh, Ø., & Totland, G. K. (1999). Transmission of viral encephalopathy and retinopathy (VER) to yolk-sac larvae of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: occurrence of nodavirus in various organs and a possible route of infection. *Diseases of aquatic organisms*, 36(2), 95-106. <https://doi.org/DOI 10.3354/dao036095>
- Grotmol, S., Totland, G. K., Thorud, K., & Hjeltne, B. K. (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*. *Diseases of aquatic organisms*, 29(2), 85-97. <https://doi.org/DOI 10.3354/dao029085>
- Guo, Y. X., Wei, T., Dallmann, K., & Kwang, J. (2003). Induction of caspase-dependent apoptosis by betanodaviruses GGNNV and demonstration of protein α as an apoptosis inducer. *Virology*, 308(1), 74-82.
- Haddad-Boubaker, S., Bigarré, L., Bouzgarou, N., Megdich, A., Baud, M., Cabon, J., & Chéhida, N. B. (2013). Molecular epidemiology of betanodaviruses isolated from sea bass and sea bream cultured along the Tunisian coasts. *Virus Genes*, 46(3), 412-422. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0869-8>
- Hata, N., Okinaka, Y., Iwamoto, T., Kawato, Y., Mori, K.-I., & 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 Pathology*, 42(4), 225-228.
- Hegde, A., Teh, H., Lam, T., & Sin, Y. (2003). Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poecilia reticulata*—comparative characterization and pathogenicity studies. *Archives of Virology*, 148(3), 575-586. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0936-x>
- Hick, P., Schipp, G., Bosmans, J., Humphrey, J., & Whittington, R. (2011). Recurrent outbreaks of viral nervous necrosis in intensively cultured barramundi (*Lates calcarifer*) due to horizontal transmission of betanodavirus and recommendations for disease control. *Aquaculture*, 319(1-2), 41-52.
- Hick, P., & Whittington, R. J. (2010). Optimisation and validation of a real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of betanodavirus. *Journal of virological methods*, 163(2), 368-377. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.10.027>
- Hodneland, K., Garcia, R., Balbuena, J., Zarza, C., & Fouz, B. (2011). Real-time RT-PCR detection of betanodavirus in naturally and experimentally infected fish from Spain. *Journal of Fish Diseases*, 34(3), 189-202. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01227.x>
- Huang, Y. C., Lin, T. S., Peng, C., Chan, N. L., & Han, Y. S. (2016). Strong inhibition of betanodavirus replication by ribavirin targeting RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of Fish Diseases*, 39(5), 619-623. <https://doi.org/10.1111/jfd.12398>
- Húsgar, S., Grotmol, S., Hjeltne, B. K., Rødseth, O. M., & Biering, E. (2001). Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV)

- in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV. *Diseases of aquatic organisms*, 45(1), 33-44.
- Hwang, J., Suh, S.-S., Park, M., Oh, M.-J., Kim, J.-O., Lee, S., & Lee, T.-K. (2016). Detection of coat protein gene of nervous necrosis virus using loop-mediated isothermal amplification. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(3), 235-240. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.01.035>
- Iwamoto, T., Mise, K., Takeda, A., Okinaka, Y., Mori, K.-I., 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(10), 2807-2816. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80902-0>
- Iwamoto, T., Nakai, T., Mori, K.-i., Arimoto, M., & Furusawa, I. (2000). Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Diseases of aquatic organisms*, 43(2), 81-89. <https://doi.org/10.3354/dao043081>
- Iwamoto, T., Okinaka, Y., Mise, K., Mori, K.-I., Arimoto, M., Okuno, T., & 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), 1256-1262.
- Jaramillo, D., Hick, P., Deece, K., Tweedie, A., Kirkland, P., Arzey, E., & Whittington, R. J. (2016). Comparison of ELISA formats for detection of antibodies specific for nervous necrosis virus (Betanodavirus) in the serum of immunized barramundi *Lates calcarifer* and Australian bass *Macquaria novemaculeata*. *Aquaculture*, 451, 33-38.
- Johansen, R., Amundsen, M., Dannevig, B., & Sommer, A. (2003). Acute and persistent experimental nodavirus infection in spotted wolffish *Anarhichas minor*. *Diseases of aquatic organisms*, 57(1-2), 35-41. <https://doi.org/10.3354/dao057035>
- Johansen, R., Ranheim, T., Hansen, M., Taksdal, T., & Totland, G. (2002). Pathological changes in juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* persistently infected with nodavirus. *Diseases of aquatic organisms*, 50(3), 161-169.
- Johansen, R., Sommerset, I., Tørud, B., Korsnes, K., Hjortaas, M., Nilsen, F., Nerland, A., & Dannevig, B. (2004). Characterization of nodavirus and viral encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 27(10), 591-601. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00581.x>
- Kai, Y.-H., & Chi, S.-C. (2008). Efficacies of inactivated vaccines against betanodavirus in grouper larvae (*Epinephelus coioides*) by bath immunization. *Vaccine*, 26(11), 1450-1457. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.12.043>
- Kai, Y.-H., Su, H.-M., Tai, K.-T., & Chi, S.-C. (2010). Vaccination of grouper broodfish (*Epinephelus tukula*) reduces the risk of vertical transmission by nervous necrosis virus. *Vaccine*, 28(4), 996-1001. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.132>
- Kaplan, M., & Karaoğlu, M. T. (2021). Investigation of betanodavirus in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at all production stages in all hatcheries and on selected farms in Turkey. *Archives of Virology*, 166(12), 3343-3356.
- Kaplan, M., Pekmez, K., Cagiran, A. A., Arslan, F., Ozkan, B., & Kalayci, G. (2022). The first detection of betanodavirus reassortant genotype (RGNNV/SJNNV) isolated from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in the Turkish coastlines: The importance of screening and monitoring studies for identifying the source of the infection. *J Fish Dis*, 45(6), 783-793. <https://doi.org/10.1111/jfd.13603>
- Kaplan, M., Pekmez, K., Özkan, B., Çağiran, A. A., & Kalaycı, G. (2021). Detection of RGNNV genotype betanodavirus in the Black Sea and monitoring studies. *Diseases of aquatic organisms*, 144, 117-121. <https://doi.org/10.3354/dao03583>

- Kara, H., Chaoui, L., Derbal, F., Zaidi, R., De Boissésou, C., Baud, M., & Bigarré, L. (2014). Betanodavirus-associated mortalities of adult wild groupers *E. pinephelus marginatus* (Lowe) and *E. pinephelus costae* (Steindachner) in Algeria. *Journal of Fish Diseases*, 37(3), 273-278.
- Kim, J.-O., Kim, W.-S., & Oh, M.-J. (2019). Investigation of nervous necrosis virus (NNV) replication in vitro using RNA in situ hybridization. *Virus research*, 260, 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.11.011>
- Korsnes, K., Karlsbakk, E., Devold, M., Nerland, A., & 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.). *Journal of Fish Diseases*, 32(8), 655-665. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01035.x>
- Korsnes, K., Karlsbakk, E., Skår, C. K., Sælemyr, L., Nylund, A., Kvamme, B. O., & Mortensen, S. (2017). High nervous necrosis virus (NNV) diversity in wild wrasse (Labridae) in Norway and Sweden. *Diseases of aquatic organisms*, 126(1), 43-50. <https://doi.org/10.3354/dao03159>
- Kuan, Y.-C., Sheu, F., Lee, G.-C., Tsai, M.-W., Hung, C.-L., & Nan, F.-H. (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 & shellfish immunology*, 32(6), 986-993. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.02.008>
- Kuo, H.-C., Wang, T.-Y., Hsu, H.-H., Chen, P.-P., Lee, S.-H., Chen, Y.-M., Tsai, T.-J., Wang, C.-K., Ku, H.-T., & Lee, G.-B. (2012). Nervous necrosis virus replicates following the embryo development and dual infection with iridovirus at juvenile stage in grouper. *PLoS One*, 7(4), e36183.
- Le Breton, A., Grisez, L., Sweetman, J., & Ollevier, F. (1997). Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 20(2), 145-151.
- Li, C., Liu, J., Zhang, X., Yu, Y., Huang, X., Wei, J., & Qin, Q. (2020). Red grouper nervous necrosis virus (RGNNV) induces autophagy to promote viral replication. *Fish Shellfish Immunol*, 98, 908-916. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.053>
- Lin, C.-C., Lin, J. H.-Y., Chen, M.-S., & Yang, H.-L. (2007). An oral nervous necrosis virus vaccine that induces protective immunity in larvae of grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture*, 268(1-4), 265-273.
- Liu, C., Zhang, J., Yi, F., Wang, J., Wang, X., Jiang, H., Xu, J., & Hu, Y. (2006). Isolation and RNA1 nucleotide sequence determination of a new insect nodavirus from *Pieris rapae* larvae in Wuhan city, China. *Virus research*, 120(1-2), 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.09.003>
- López-Muñoz, A., Sepulcre, M. P., García-Moreno, D., Fuentes, I., Béjar, J., Manchado, M., Álvarez, M. C., Meseguer, J., & Mulero, V. (2012). Viral nervous necrosis virus persistently replicates in the central nervous system of asymptomatic gilthead seabream and promotes a transient inflammatory response followed by the infiltration of IgM+ B lymphocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 37(3-4), 429-437. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.02.007>
- Lopez-Jimena, B., Cherif, N., Garcia-Rosado, E., Infante, C., Cano, I., Castro, D., Hammami, S., Borrego, J. J., & Alonso, M. d. C. (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), 1361-1369. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04759.x>

- Low, C., Nataqain, S., Chee, N., Rozaini, M., & Najiah, M. (2017). Betanodavirus: Dissection of the viral life cycle. *Journal of Fish Diseases*, 40(11), 1489-1496. <https://doi.org/10.1111/jfd.12638>
- Ma, H., Wen, W., Su, Y., Feng, J., Xu, L., Peng, C., & Guo, Z. (2015). Epidemiological characterization of VNNV in hatchery-reared and wild marine fish on Hainan Island, China, and experimental infection of golden pompano (*Trachinotus ovatus*) juveniles. *Archives of Virology*, 160(12), 2979-2989. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2590-0>
- Mazelet, L., Dietrich, J., & Rolland, J. (2011). New RT-qPCR assay for viral nervous necrosis virus detection in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.): application and limits for hatcheries sanitary control. *Fish & shellfish immunology*, 30(1), 27-32. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.08.015>
- Mladineo, I. (2003). The immunohistochemical study of nodavirus changes in larval, juvenile and adult sea bass tissue. *Journal of Applied Ichthyology*, 19(6), 366-370.
- Moody, N., Horwood, P., Reynolds, A., Mahony, T., Anderson, I., & Oakey, H. (2009). Phylogenetic analysis of betanodavirus isolates from Australian finfish. *Diseases of aquatic organisms*, 87(3), 151-160. <https://doi.org/10.3354/dao02130>
- Moody, N. J., Horwood, P., & McHardy, S. (2004). *Aquatic Animal Health Subprogram: development of diagnostic tests for the detection of nodavirus*. Department of Primary Industries and Fisheries.
- Mori, K.-i., Mangyoku, T., Iwamoto, T., Arimoto, M., Tanaka, S., & Nakai, T. (2003). Serological relationships among genotypic variants of betanodavirus. *Diseases of aquatic organisms*, 57(1-2), 19-26.
- Mori, K.-i., Mushiake, K., & Arimoto, M. (1998). Control measures for viral nervous necrosis in striped jack. *Fish Pathology*, 33(4), 443-444.
- Mori K, N. T., Muroga K, Arimoto M, Mushiake K, & I, F. (1992). Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, 1(187), 368-371.
- Munday, B., Kwang, J., & Moody, N. (2002). Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *Journal of Fish Diseases*, 25(3), 127-142.
- Munday, B., Langdon, J., Hyatt, A., & Humphrey, J. (1992). Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Aquaculture*, 103(3-4), 197-211.
- Murphy, F., Fauquet, C., Bishop, D., Ghabrial, S., Jarvis, A., Martelli, G., Mayo, M., & Summers, M. (1995). Virus taxonomy: sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, 10, 350-354.
- Mushiake, K., Nishizawa, T., Nakai, T., Furusawa, I., & 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 Pathology*, 29(3), 177-182.
- Nagai, & Nishizawa. (1999). Sequence of the non-structural protein gene encoded by RNA1 of striped jack nervous necrosis virus. *Journal of General Virology*, 80(11), 3019-3022. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-11-3019>
- Nakai, T., Dung, N. H., Nishizawa, T., Muroga, K., Arimoto, M., & Ootsuki, K. (1994). Occurrence of viral nervous necrosis in kelp grouper and tiger puffer. *Fish Pathology*, 29(3), 211-212.
- Nguyen, H., Mushiake, K., Nakai, T., & Muroga, K. (1997). Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack. *Diseases of aquatic organisms*, 28(2), 87-91.

- Nguyen, H., 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.
- Nishioka, T., Sugaya, T., Kawato, Y., Mori, K.-i., & Nakai, T. (2016). Pathogenicity of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) isolated from asymptomatic wild Japanese jack mackerel *Trachurus japonicus*. *Fish Pathology*, 51(4), 176-183.
- Nishizawa, T., Furuhashi, M., Nagai, T., Nakai, T., & Muroga, K. (1997). Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Applied and environmental microbiology*, 63(4), 1633-1636. <https://doi.org/10.1128/aem.63.4.1633-1636.1997>
- Nishizawa, T., Kise, M., Nakai, T., & Muroga, K. (1995a). Neutralizing monoclonal antibodies to striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Fish Pathology*, 30(2), 111-114.
- Nishizawa, T., Mori, K.-i., Furuhashi, M., Nakai, T., Furusawa, I., & 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), 1563-1569. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-7-1563>
- Nishizawa, T., Muroga, K., & Arimoto, M. (1996). Failure of the polymerase chain reaction (PCR) method to detect striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in striped jack *Pseudocaranx dentex* selected as spawners. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8(4), 332-334.
- Nishizawa, T., K., M., T., N., Furusawa, I., & K., M. (1994). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Diseases of aquatic organisms*, 18, 103-107.
- Nopadon, P., Aranya, P., Tipaporn, T., Toshihiro, N., Takayuki, K., Masashi, M., & Makoto, E. (2009). Nodavirus associated with pathological changes in adult spotted coralgroupers (*Plectropomus maculatus*) in Thailand with viral nervous necrosis. *Research in veterinary science*, 87(1), 97-101. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.01.004>
- Núñez-Ortiz, N., Stocchi, V., Toffan, A., Pascoli, F., Sood, N., Buonocore, F., Picchietti, S., Papeschi, C., Taddei, A., & Thompson, K. (2016). Quantitative immunoenzymatic detection of viral encephalopathy and retinopathy virus (betanodavirus) in sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Fish Diseases*, 39(7), 821-831. <https://doi.org/10.1111/jfd.12415>
- WOAH. (2019). Viral Encephalopathy and Retinopathy.
- Olveira, J., Souto, S., Dopazo, C., & Bandín, I. (2013). Isolation of betanodavirus from farmed turbot *Psetta maxima* showing no signs of viral encephalopathy and retinopathy. *Aquaculture*, 406, 125-130.
- Olveira, J. G., Souto, S., Dopazo, C. P., Thiery, R., Barja, J. L., & Bandin, I. (2009). Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. *Journal of General Virology*, 90(12), 2940-2951. <https://doi.org/10.1099/vir.0.013912-0>
- Özyer, B. Ö., Kalaycı, G., İnçoğlu, Ş., Pekmez, K., & Küçükali, Y. (2014). The first isolation of betanodavirus from cultured seabass in Turkey. *Bornova Veteriner Bilimleri Dergisi*, 36(50), 13-17.

- Padrós, F., Caggiano, M., Toffan, A., Constenla, M., Zarza, C., & Ciulli, S. (2022). Integrated Management Strategies for Viral Nervous Necrosis (VNN) Disease Control in Marine Fish Farming in the Mediterranean. *Pathogens*, 11(3), 330. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030330>
- Panzarin, 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. *Archives of Virology*, 155(8), 1193-1203. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0701-5>
- Panzarin, Toffan, A., Abbadi, M., Buratin, A., Mancin, M., Braaen, S., Olsen, C. M., Bargelloni, L., Rimstad, E., & Cattoli, G. (2016). Molecular basis for antigenic diversity of genus Betanodavirus. *PLoS One*, 11(7), e0158814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158814>
- Panzarin, V., Cappellozza, E., Mancin, M., Milani, A., Toffan, A., Terregino, C., & 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. <https://doi.org/Artn 56>
10.1186/1297-9716-45-56
- Panzarin, V., Fusaro, A., Monne, I., Cappellozza, E., Patarnello, P., Bovo, G., Capua, I., Holmes, E. C., & Cattoli, G. (2012). Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. *Infection, genetics and evolution*, 12(1), 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.10.007>
- Parameswaran, V., Kumar, S. R., Ahmed, V. I., & Hameed, A. S. (2008). A fish nodavirus associated with mass mortality in hatchery-reared Asian Sea bass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture*, 275(1-4), 366-369.
- Peducasse, S., Castric, J., Thiery, R., Jeffroy, J., Le Ven, A., & Laurencin, F. B. (1999). Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways. *Diseases of aquatic organisms*, 36(1), 11-20. <https://doi.org/10.3354/dao036011>
- Scherer, W., & Hurlbut, H. (1967). Nodamura virus from Japan: a new and unusual arbovirus resistant to diethyl ether and chloroform. *American Journal of Epidemiology*, 86(2), 271-285. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120737>
- Schneemann, A., Reddy, V., & Johnson, J. E. (1998). The structure and function of nodavirus particles: a paradigm for understanding chemical biology. *Advances in virus research*, 50, 381-446. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(08\)60812-x](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60812-x)
- Shetty, M., Maiti, B., Shivakumar Santhosh, K., Venugopal, M. N., & Karunasagar, I. (2012). Betanodavirus of marine and freshwater fish: distribution, genomic organization, diagnosis and control measures. *Indian Journal of Virology*, 23(2), 114-123. <https://doi.org/10.1007/s13337-012-0088-x>
- Sommerset, I., Lorenzen, E., Lorenzen, N., Bleie, H., & Nerland, A. H. (2003). A DNA vaccine directed against a rainbow trout rhabdovirus induces early protection against a nodavirus challenge in turbot. *Vaccine*, 21(32), 4661-4667. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(03\)00526-7](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00526-7)
- Sommerset, I., & Nerland, A. H. (2004). Complete sequence of RNA1 and subgenomic RNA3 of Atlantic halibut nodavirus (AHNV). *Diseases of aquatic organisms*, 58(2-3), 117-125. <https://doi.org/10.3354/dao058117>
- Souto, S., Merour, E., Biacchesi, S., Bremont, M., Oliveira, J. G., & Bandín, I. (2015). In vitro and in vivo characterization of molecular determinants of virulence in reassortant betanodavirus. *Journal of General Virology*, 96(6), 1287-1296. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000064>

- Souto, S., Oliveira, J. G., Alonso, M. C., Dopazo, C. P., & Bandín, I. (2018). Betanodavirus infection in bath-challenged *Solea senegalensis* juveniles: A comparative analysis of RGNNV, SJNNV and reassortant strains. *Journal of Fish Diseases*, 41(10), 1571-1578. <https://doi.org/10.1111/jfd.12865>
- Souto, S., Vázquez-Salgado, L., Oliveira, J. G., & Bandín, I. (2019). Amino acidic substitutions in the polymerase N-terminal region of a reassortant betanodavirus strain causing poor adaptation to temperature increase. *Veterinary research*, 50(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0669-4>
- Tan, C., Huang, B., Chang, S. F., Ngoh, G. H., Munday, B., Chen, S. C., & Kwang, J. (2001). Determination of the complete nucleotide sequences of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) nervous necrosis virus, Singapore strain. *Journal of General Virology*, 82(3), 647-653. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-3-647>
- Tanaka, S., Aoki, H., & Nakai, T. (1998). Pathogenicity of the nodavirus detected from diseased sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish Pathology*, 33(1), 31-36.
- Tanaka, S., Takagi, M., & Miyazaki, T. (2004). Histopathological studies on viral nervous necrosis of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, at the grow-out stage. *J Fish Dis*, 27(7), 385-399. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00559.x>
- Tanaka, S., Takagi, M., & 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), 385-399.
- Thiery, R., Cozien, J., de Boisseson, C., Kerbart-Boscher, S., & Nevarez, L. (2004). Genomic classification of new betanodavirus isolates by phylogenetic analysis of the coat protein gene suggests a low host-fish species specificity. *Journal of General Virology*, 85(10), 3079-3087. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80264-0>
- Toffan, A., Panzarin, V., Toson, M., Cecchetti, K., & Pascoli, F. (2016). Water temperature affects pathogenicity of different betanodavirus genotypes in experimentally challenged *Dicentrarchus labrax*. *Diseases of aquatic organisms*, 119(3), 231-238. <https://doi.org/10.3354/dao03003>
- Toffan, A., Pascoli, F., Pretto, T., Panzarin, V., Abbadi, M., Buratin, A., Quartesan, R., Gijon, D., & Padros, F. (2017). Viral nervous necrosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) caused by reassortant betanodavirus RGNNV/SJNNV: an emerging threat for Mediterranean aquaculture. *Sci Rep*, 7, 46755. <https://doi.org/10.1038/srep46755>
- Toffolo, V., Negrisol, 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. *Molecular phylogenetics and evolution*, 43(1), 298-308.
- Vendramin, N., Toffan, A., Mancin, M., Cappelozza, E., Panzarin, V., Bovo, G., Cattoli, G., Capua, I., & 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(4), 371-383.
- Venter, P. A., & Schneemann, A. (2008). Recent insights into the biology and biomedical applications of Flock House virus. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(17), 2675-2687.
- Vimal, S., Majeed, S. A., Nambi, K., Madan, N., Farook, M., Venkatesan, C., Taj, G., Venu, S., Subburaj, R., & Thirunavukkarasu, A. (2014). Delivery of DNA vaccine using chitosan-tripolyphosphate (CS/TPP) nanoparticles in Asian sea bass, *Lateolabrax niloticus* (Bloch, 1790) for protection against nodavirus infection. *Aquaculture*, 420, 240-246.

- Wang, Y.-D., Kung, C.-W., & Chen, J.-Y. (2010). Antiviral activity by fish antimicrobial peptides of epinecidin-1 and hepcidin 1–5 against nervous necrosis virus in medaka. *Peptides*, 31(6), 1026-1033. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.02.025>
- Wang, Y.-D., Rajanbabu, V., & Chen, J.-Y. (2015). Transcriptome analysis of medaka following epinecidin-1 and TH1-5 treatment of NNV infection. *Fish & shellfish immunology*, 42(1), 121-131. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.040>
- Watanabe, K.-i., Ide, K., Iwasaki, T., Satoh, J., Mori, K.-i., & Mekata, T. (2013). Disinfection of fertilized grouper eggs with electrolyzed seawater for prevention of viral nervous necrosis. *Gyobyo Kenkyu= Fish Pathology*, 48(1), 5-8.
- Watanabe, K.-i., Nishizawa, T., & Yoshimizu, M. (2000). Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Diseases of aquatic organisms*, 41(3), 219-223. <https://doi.org/10.3354/dao041219>
- Watanabe, K.-i., Suzuki, S., Nishizawa, T., Suzuki, K., Yoshimizu, M., & Ezura, Y. (1998). Control strategy for viral nervous necrosis of barfin flounder. *Fish Pathology*, 33(4), 445-446.
- 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.
- Yoshimizu, M. (1997). Antibody screening for the identification of nervous necrosis virus carriers in a flounder brood stock. New approaches to viral diseases of aquatic animals, NRIA International Workshop, 1997.

EKLER

Ek 1. VNNV.TR.Samsun.01 RNA1 (Genbank No: OP933715)

CATACAACGCCCCAAATTACCCCAGGAACATTTCAACCGTTCCGCA
CACCCAAAACGTTAAGTTGTCCAGCTACACCTACGCTTTCAAAGCCAGTG
TTCTCCAGCATGTTCCGTGGTACATGCCAACGCACACACCAGCGGAAATC
GCTGACGCAGTGCAAACTTGGCCGCAAGTTCCACTGAGCTGGTTGAAA
CTGACTACAGCAAGTTCGATGGCACATTCTTGCGCTTCATGCGTGAGTGC
GTCGAATTTGCCATTTACAAGCGCTGGGTTCACCTGGACCACTTGCCAGA
GTTAACAACCTTATTGGCTAATGAGATCCAAGCACCTGCTGTTACACGAC
TGGGCATCAAGTATGATCCTGATTGCAGTCGCCTCAGTGGTTCTGCTCTT
ACGACAGACGGAAACAGCATTGCTAATGCTTTCGTCTCATACTTGCTGG
TCGCATGGCTGGCATGGATGATGATGAAGCTTGGTCTTGGATCGGCATTG
TCTACGGTGATGATGGGCTCCGATCTGGTAATGTTTCAAATGAGCTCCTC
ACCAACACTGCTTCTTCACTCGGCTTTGACTTGAAAATAGTGAATCGCGC
GCCACGTGGCTCTCCAGTGACATTTCTGTCTCGAGTATACCTCGATCCTTG
GTCCTCACCGGCTTCCGTGCAGTCGCCATTAAGAACATTATTGAAATTGC
ACACCACCTGTGATACCCAGTCAGAGATTGACGACATTGGCTGGGCTAA
GACACAGGCGTATTTGGTCACTGATAGCAAGACACCTTTTATTGGTCACT
GGTGCCGGGCTTATCAGAGAAATTGCACTGCACGTGTGGTTCAGTATGCA
GACTACACTGACATTCCATTCTGGGTGAAGAATGACGACCACGTTGGCAA
CTCGTGGCCGCAGTCTGAATCCGATGACTGGAATGACGTTGTAGCCAACG
AGCTTGGCGTCACCACCGCTGAGCTGTTGAAGCATCTTGCACTCCTGGAT
GCTTATACTGGTCCCATTAGTGGCCTCCCACGTCTGACAACATCAATCGA
TTTGGAACCAAAGATGTCTGTCGCATTAGACGGGGAGATCCAAGCCGGT
CCTAGTCAAAACAAAACCTAGCAAGGATGGAACAAATCCAACAAGCGATC
GATCAGCACCTCGTCGAGCTCGAGCAGCTCTTCCAGGTGATGATGGACAC
GCGCGTCGCTCTCGGCGGAGGAG

Ek 2. VNNV.TR.Samsun.01 RNA2 (Genbank No: OP933716)

GCGAATCCGCAACCCCGCCGACGTGCTAACAATCGTCGGCGTAGTA
ATCGCACTGACGCACCTGTGTCTAAGGCCTCGACTGTAAGTGGATTTGGA
CGTGGGACCAATGACGTCCATCTCTCAGGTATGTCGAGAATCTCCCAGGC
CGTCCTCCCAGCCGGGACAGGAACAGACGGATACGTTGTTGTTGATGCA
ACCATCGTCCCCGACCTCCTACCACGACTGGGACACGCTGCTAGAATCTT
CCAGCGATACGCTGTTGAAACACTGGAGTTTGAAATTCAGCCAATGTGCC
CCGCAAACACGGGCGGTGGTTACGTTGCTGGCTTCCTGCCTGATCCAAT
GACAACGATCACACCTTCGACGCGCTTCAAGCAACTCGTGGTGCAGTCGT
TGCCAAATGGTGGGAAAGCAGAACAGTCCGGCCCCAGTACACCCGCACG
CTCCTCTGGACCTCGTCGGGAAAGGAGCAGCGTCTCACGTCACCTGGTCG
GCTGATACTCCTGTGTGTTGGCAACAACACTGATGTGGTCAACGTGTCAG
TGCTGTGTCGCTGGAGTGTTGACTGAGCGTTCCATCTCTTGAGACACCT
GAAGAGACCACCGCTCCCATCATGACACAAGGTTCCCTGTACAACGATTC
CCTTTCCACAAATGACTTCAAGTCCATCCTCCTAGGATCCACACCACTGG
ACATTGCCCCTGATGGAGCAATCTTCCAGCTGGACCGTCCGCTGTCTATT
GACTACAGCCTTGGAACCTGGAGATGTTGACCGTGCTGTTTACTGGCACCT
CAAGAAGTTTGCTGGAAATGCTGGCACACCTGCAGGCTGGTTTCGCTGGG
GCATCTGGGACAACTTCAACAAGACGTTACAGATGGCGTTGCCTACTAC
TCTGATGAGCAGCCCCGTCAAATCCTGCTGCCTGTG

Ek 3. RNA1 Filogenetik Ağacı Oluşturulurken Kullanılan Sekans Bilgileri

Genbank Numarası	Organizma	Ülke	Yıl	Genotip
JN189865	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	2012	RGNNV
OM513981	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Hırvatistan	2014	RGNNV
OM513981	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Hırvatistan	2014	RGNNV
MF144242	<i>Epinephelus coioides</i>	Tayvan	2013	RGNNV
KY930893	<i>Epinephelus coioides</i>	Tayvan	2014	RGNNV
FJ809938	<i>Epinephelus morio</i>	Tayvan	2003	RGNNV
FJ803915	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İspanya	2008	RGNNV
GQ402010	<i>Lates calcarifer</i>	Avusturalya	2007	RGNNV
MH758753	<i>Lates calcarifer</i>	Hindistan	2016	RGNNV
KC696563	<i>Psetta maxima</i>	İspanya	2010	RGNNV
AB056571	<i>Caranx vinctus</i>	Japonya	2001	SJNNV
NC003448	<i>Caranx vinctus</i>	Japonya	2001	SJNNV
AY690597	<i>Epinephelus morio</i>	Tayvan	2002	RGNNV
EF558368	<i>Epinephelus akaara</i>	Çin	2012	RGNNV
FJ789783	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Tunus	2009	RGNNV
MZ054261	<i>Epinephelus lanceolatus</i>	Avusturalya	2018	RGNNV
KJ541747	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	Çin	2012	RGNNV
GQ402012	<i>Macquaria novemaculeata</i>	Avusturalya	2006	RGNNV
AY369136	<i>Epinephelus coioids</i>	Çin	2003	RGNNV
KY315688	<i>Anguilla marmorata</i>	Tayvan	2013	RGNNV
MN709776	<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	Çin	2019	RGNNV
EU236148	<i>Takifugu rubripes</i>	Japonya	2007	TPNNV
EU236146	<i>Gadus macrocephalus</i>	Japonya	2007	BFNNV
MG874757	<i>Epinephelus coioides</i>	Çin	2016	RGNNV
KP455643	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Çin	2014	RGNNV
KM095958	<i>Epinephelus septemfasciatus</i>	Güney Kore	2008	RGNNV
AB373028	<i>Hyporthodus septemfasciatus</i>	Japonya	2007	RGNNV
AY721616	<i>Epinephelus lanceolatus</i>	Çin	2004	RGNNV
FJ748760	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Güney Kore	2009	RGNNV

AY324869	<i>Epinephelus septemfasciatus</i>	Japonya	1997	RGNNV
JQ073720	<i>Lates calcarifer</i>	Hindistan	2006	RGNNV
AF319555	<i>Epinephelus tauvina</i>	Singapur	2001	RGNNV
JN189909	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	2005	RGNNV
AJ401165	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Norveç	2001	BFNNV
EU826137	<i>Verasper moseri</i>	Japonya	2008	BFNNV
EF617331	<i>Gadus morhua</i>	Norveç	2007	BFNNV
EF617335	<i>Gadus morhua</i>	Norveç	2008	BFNNV
EF617330	<i>Gadus morhua</i>	Norveç	2007	BFNNV
JN189814	<i>Solea senegalensis</i>	İspanya	2009	SJNNV
KF386163	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	1996	SJNNV
KF668184	<i>Epinephelus fuscogutattus</i>	Çin	2013	RGNNV

Ek 4. RNA2 Filogenetik Ağacı Oluşturulurken Kullanılan Sekans Bilgileri

AY744705	<i>Epinephelus akaara</i>	Çin	2007	RGNNV
AB373029	<i>Epinephelus septemfasciatus</i>	Japonya	2008	RGNNV
KT390714	<i>Epinephelus lanceolatus</i>	Avusturalya	2014	RGNNV
MN097799	<i>Kuhlia rupestris</i>	Avusturalya	2016	RGNNV
KC696562	<i>Psetta maxima</i>	İspanya	2010	RGNNV
HM485328	<i>Lates calcarifer</i>	Hindistan	2006	RGNNV
FR669249	<i>Lates calcarifer</i>	Hindistan	2006	RGNNV
AY324870	<i>Epinephelus septemfasciatus</i>	Japonya	1997	RGNNV
MH758754	<i>Lates calcarifer</i>	Hindistan	2016	RGNNV
NC008041	<i>Epinephelus septemfasciatus</i>	Japonya	2003	RGNNV
MW590702	<i>Epinephelus lanceolatus</i>	Avusturalya	2018	RGNNV
FJ789784	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Tunus	2010	RGNNV
KY315689	<i>Anguilla marmorata</i>	Tayvan	2013	RGNNV
GQ402013	<i>Macquaria novemaculeata</i>	Avusturalya	2006	RGNNV
GQ402011	<i>Lates calcarifer</i>	Avusturalya	2007	RGNNV
MN105076	<i>Epinephelus morio</i>	Çin	2018	RGNNV
EF558369	<i>Epinephelus akaara</i>	Çin	2012	RGNNV
AY690596	<i>Epinephelus morio</i>	Tayvan	2004	RGNNV
EU391590	<i>Epinephelus akaara</i>	Tayvan	2008	RGNNV
EU236147	<i>Verasper moseri</i>	Japonya	2007	BFNNV
EU826138	<i>Verasper moseri</i>	Japonya	2008	BFNNV
NC003449	<i>Caranx vinctus</i>	Japonya	2001	SJNNV
AB056572	<i>Caranx vinctus</i>	Japonya	2001	SJNNV
EU236149	<i>Takifugu rubripes</i>	Japonya	2007	TPNNV
JX402858	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tayland	2011	RGNNV
AY140798	<i>Epinephelus coioides</i>	Tayvan	2003	RGNNV
AY140801	<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	Tayvan	2003	RGNNV
DQ116035	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Güney Kore	2005	RGNNV
DQ116037	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Güney Kore	2005	RGNNV
DQ116038	<i>Mugil cephalus</i>	Güney Kore	2005	RGNNV
DQ116036	<i>Epinephelus septemfasciatus</i>	Güney Kore	2005	RGNNV

MH017207	<i>Epinephelus marginatus</i>	Avusturalya	2013	RGNNV
KJ541748	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	Çin	2012	RGNNV
KF668183	<i>Epinephelus fuscoguttatus</i> x <i>E. lanceolatus</i>	Çin	2013	RGNNV
DQ864760	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Güney Kore	2006	RGNNV
FJ829452	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İspanya	2008	RGNNV
AF318942	<i>Epinephelus tauvina</i>	Singapur	2001	RGNNV
GU953669	<i>Lates calcarifer</i>	Hindistan	2009	RGNNV
JF412273	<i>Lates calcarifer</i>	Hindistan	2011	RGNNV
AF534998	<i>Epinephelus coioides</i>	Çin	2003	RGNNV
EF617327	<i>Gadus morhua</i>	Norveç	2007	BFNNV
EF617328	<i>Gadus morhua</i>	Norveç	2007	BFNNV
EF617329	<i>Gadus morhua</i>	Norveç	2007	BFNNV
KP455642	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Çin	2014	RGNNV
AY835642	<i>Lutjanus stellatus</i>	Tayvan	2004	RGNNV
KM588181	<i>Epinephelus lanceolatus</i>	Tayvan	2013	RGNNV
MG874758	<i>Epinephelus coioides</i>	Çin	2016	RGNNV
MF144241	<i>Epinephelus coioides</i>	Tayvan	2013	RGNNV
KM095959	<i>Epinephelus septemfasciatus</i>	Güney Kore	2008	RGNNV
GU826692	<i>Lates calcarifer</i>	Hindistan	2008	RGNNV
KY354694	<i>Sparus aurata</i>	İtalya	2008	RGNNV
AY721615	<i>Epinephelus lanceolatus</i>	Çin	2004	RGNNV
MG637439	<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	Çin	2017	RGNNV
JN189992	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İtalya	2009	RGNNV
NC013461	<i>Takifugu rubripes</i>	Japonya	2007	TPNNV

ÖZ GEÇMİŞ

Bahadır MÜFTÜOĞLU, 2010 yılında Ordu Başöğretmen Anadolu Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 12.08.2016 tarihinde mezun oldu. 30.01.2017 yılında OMÜ Veteriner Fakültesi Viroloji Ana Bilim Dalı Doktora programına girdi. Mezuniyetinden bu yana Araştırma Görevlisi olarak görev yapan B.M., iyi/orta derecede İngilizce bilmektedir (YDS:72,5 2016).

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0002-7789-1038

Yayınlar:

1. Taskin MH, Tamer C, Muftuoglu B, Ozan E, Kilic SS, Akkoyunlu GK, Kurucay HN, Albayrak H, İgde M, Mesquita JR, Elhag AE, Gumusova S, Yazici Z The first serological detection of West Nile virus infection among residents living in northern Turkey, Journal of Vector Borne Disease, 12 / 2022
2. Ozan E, Muftuoglu B, Sahindokuyucu I, Kurucay HN, Inal S, Kuruca N, Elhag AE, Karaca E, Tamer C, Gumusova S, Albayrak H, Barry G, Gulbahar MY, Yazici Z Marek's disease virus in vaccinated poultry flocks in Turkey: its first isolation with molecular characterization, Archives of Virology, 1 / 2021, 10.1007/s00705-020-04943-6
3. Muftuoglu B, Kurucay HN, Elhag AE, Yildirim S, Cicek Y, Tamer C, Ozan E, Sahna KC, Yildirim Y, Albayrak H, Gumusova S Yazici Z A serosurvey for Bovine respirovirus 3 in Turkish domestic ruminants: The first comparison study of A and C genotypes, Veterinary Medicine and Science, 6 / 2021
4. Albayrak H, Sahindokuyucu I, Muftuoglu B, Tamer C, Kadi H, Ozan E, Yılmaz O, Kilic H, Kurucay HN, Coven F, Gumusova S, Yazici Z, Elhaq AE Sentinel serosurveillance of backyard hens proved West Nile virus circulation in the western provinces of Turkey, Veterinary Medicine and Science, 6 / 2021
5. Gumusova S, Tamer C, Ozan E, Cavunt A, Kadi H, Muftuoglu B, Elhag AI, Yazici Z, Albayrak H A serological investigation of Lumpy skin disease and Crimean-Congo

Hemorrhagic Fever in domestic water buffalo (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758) in Samsun Province of Northern Turkey, *Tropical Biomedicine*, 37, 1, 2 / 2020

6. Albayrak H, Tamer C, Ozan E, Muftuoglu B, Kadi H, Dogan F, Akman A, Cagırgan AA, Eisa AA, Kurucay HN, Gumusova S, Yazici Z Molecular identification and phylogeny of bovine herpesvirus-1(BoHV-1) from cattle associated with respiratory disorders and death in Turkey, *Medycyna Weterynaryjna*, 76, 6, 6 / 2020

7. Yazici Z, Ozan E, Tamer C, Muftuoglu B, Barry G, Kurucay HN, Elhag AE, Cagırgan AA, Gumusova S, Albayrak H Circulation of Indigenous Bovine Respiratory Syncytial Virus Strains in Turkish Cattle: The First Isolation and Molecular Characterization, *Animals*, 10, 9, 9 / 2020

8. Yazici Z, Ozan E, Tamer C, Muftuoglu B, Elhag AE, Bas O, Arslan S, Gumusova S, Albayrak H Serological study on the presence of some alphaherpesviruses in goats of northern Anatolia, Turkey, *Veterinary Research Forum*, 8 / 2020

9. Tamer C, Durmaz Y, Ozan E, Kadi H, Cavunt A, Muftuoglu B, Albayrak H Pathogenicity trials regarding Turkish isolates of infectious pancreatic necrosis virus and viral hemorrhagic septicemia virus in rainbow trout, *Aquaculture Research*, 8 / 2020

10. Yazici, Z., Gumusova, S., Tamer, C., Muftuoglu, B., Ozan, E., Arslan, S., Bas, O., Elhag, A.E.1, and Albayrak, H. The first serological report for genotype C bovine parainfluenza 3 virus in ruminant species of mid-northern Turkey: Traces from the past, *Tropical Biomedicine*, 3, 9 / 2019

Derleme

1. Ozan E, Tamer C, Muftuoglu B SARS CoV-2'nin Moleküler ve Epidemiyolojik Yönleri, 10 / 2020

2. Muftuoglu B, Albayrak H. Fare, Sıçan ve Tavşanların Viral Hastalıkları, 1, 2, 8 / 2019