

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

VİRAL HEMORAJİK SEPTİSEMİ VİRÜSÜ'NÜN (VHSV) DOĞU KARADENİZ'DE
YAŞAYAN DOĞAL BALIK TÜRLERİNDE YAYILIMI, EPİDEMİYOLOJİSİ VE
KÜLTÜR BALIKLARI ÜZERİNE VİRÜLENSİ

DOKTORA TEZİ

Balıkçılık Teknolojisi Yük. Müh. Cemil ALTUNTAŞ

MAYIS 2015

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

Trabzon

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun / / gün ve sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan :

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak hazırlanmıştır ve çalışmalar Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuvarında ve Prof. Dr. İbrahim OKUMUŞ Yetiştiricilik Ünitesi Balık Hastalıkları Islak Laboratuvarında yapılmıştır.

Tez danışmanlığımı üstlenerek gerek konu seçiminde gerekse çalışmaların sürdürülmesinde, gerekli laboratuvar altyapısının hazırlanmasında ve daha birçok konuda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Hamdi ÖĞÜT'e sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca gerek saha çalışmalarında gerekse laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Recep PARLAK'a, üniversite eğitimine başladığım günden bu güne kadar geçen sürede maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen okul-ev-iş arkadaşım ve kardeşim Arş. Gör. Bekir TUFAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Akçaabat istasyonundan örneklenen balıkların temininde her zaman desteğini gördüğüm ve bir ağabey gibi sevdiğim Olcay ZAVRAK ve Tuncay ZAVRAK'a, Çamburnu istasyonundan örneklenen balıkların temininde yardımlarını esirgemeyen gemi personelleri Sertan ERDEM ve Bülent ÇEBİ'ye, Hopa istasyonundan örneklenen balıkların temininde her konuda yardımını aldığım Coşkun ŞENYUVA'ya, deneysel çalışmalarda kullanılan balıkların temininde yardımlarını esirgemeyen Coşandere Alabalık ve Altıntaş Alabalık işletmelerine (Maçka/TRABZON), Kılıç Holding (Bafa/MUĞLA) ve İDAGIDA (Lapseki/ÇANAKKALE) sahipleri ve çalışanlarına sonsuz teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımcı olan Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Laboratuvar teknisyenleri Şener AKTAŞ ve Turgut TATLI'ya sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca doğduğum günden bu yaşıma kadar gerek maddi gerek manevi desteğini esirgemeyen aileme, canımdan çok sevdiğim eşim ELİF'e, çocuklarım ALİ DENİZ ve MUHAMMET EMİR'e sonsuz teşekkür ederim.

Cemil ALTUNTAŞ

Trabzon 2015

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum ‘‘Viral Hemorajik Septisemi Virüsü’nün (VHSV) Doğu Karadeniz’de Yaşayan Doğal Balık Türlerinde Yayılımı, Epidemiyolojisi ve Kültür Balıkları Üzerine Virülensi’’ başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Hamdi ÖĞÜT’ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 11/05/2015

İMZA

Cemil ALTUNTAŞ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VIII
SUMMARY.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Viral Hemorajik Septisemi (VHS).....	1
1.1.1. VHS'nin Yayılımı.....	3
1.1.2. VHS'nin Klinik Belirtileri.....	4
1.1.3. VHS'nin Teşhisi ve Viral Örnekleme Yöntemi.....	5
1.1.4. Tedavi.....	6
1.2. Önceki Yapılan Çalışmalar.....	7
1.3. Çalışmanın Amacı/Amaçları.....	13
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	14
2.1. Saha Çalışmaları.....	14
2.1.1. Örneklenen Balık Türleri.....	15
2.1.1.1. Barbunya (<i>Mullus barbatus</i> , Linnaeus, 1758).....	15
2.1.1.2. Çaç (<i>Sprattus sprattus phalericus</i> , Risso, 1827).....	15
2.1.1.3. Çinekop (<i>Pomatomus saltatrix</i> , Linnaeus, 1766).....	15
2.1.1.4. Dikenli Vatoz (<i>Raja clavata</i> , Linnaeus, 1758).....	15
2.1.1.5. Dil Balığı (<i>Solea sp.</i>).....	15
2.1.1.6. Gelincik (<i>Gaidropsarus vulgaris</i> , Cloquet, 1824).....	16
2.1.1.7. Kömürcü Kayası (<i>Gobius niger</i> , Linnaeus, 1758) ve Kum Kayası (<i>Neogobius melanostomus</i> , Pallas, 1814).....	16

2.1.1.8.	Hamsi (<i>Engraulis encrasicolus</i> , Linnaeus, 1758).....	16
2.1.1.9.	İskorpit (<i>Scorpaena porcus</i> , Linnaeus, 1758).....	16
2.1.1.10	İstavrit (<i>Trachurus mediterraneus</i> , Steindachner, 1868).....	17
2.1.1.11.	İzmarit (<i>Spicara smaris</i> , Linnaeus, 1758).....	17
2.1.1.12.	Kayış Balığı (<i>Ophidion barbatum</i> , Linnaeus, 1758).....	17
2.1.1.13.	Kurbağa Balığı (<i>Uranoscopus scaber</i> , Linnaeus, 1758).....	17
2.1.1.14.	Mezgit (<i>Merlangius merlangus euxinus</i> , Linnaeus, 1758).....	18
2.1.1.15.	Sardalya (<i>Sardina pilchardus</i> , Walbaum, 1792).....	18
2.1.1.16.	Tirsi (<i>Alosa immaculata</i> , Bennett, 1835).....	18
2.1.1.17.	Zargana (<i>Belone belone</i> , Linnaeus, 1758).....	19
2.1.2.	Prevalens Hesaplamaları.....	19
2.1.3.	Balıkların Viral Örneklenmesi.....	19
2.2.	Virüslerin Tanımlanması.....	20
2.2.1.	RNA Ekstraksiyonu.....	20
2.2.2.	Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	21
2.2.3.	Sekans Analizleri.....	22
2.3.	Deneysel Enfeksiyon Çalışmaları.....	22
2.3.1.	Deney Düzeneği.....	22
2.3.2.	Deneysel Enfeksiyon Çalışmalarında Kullanılan Balıklar.....	23
2.3.2.1.	Alabalıklar (<i>S. trutta labrax</i> , <i>S. fontinalis</i> ve <i>O. mykiss</i>).....	23
2.3.2.2.	Çipura (<i>Sparus aureta</i>) ve Levrek (<i>Dicentrarchus labrax</i>) Balıkları.....	24
2.3.3.	Deneysel Enfeksiyonlar İçin Virüs Hazırlanması.....	24
2.3.4.	Balıkların Virüse Maruz Bırakılması.....	24
2.3.4.1.	Alabalıkların Virüse Maruz Bırakılması.....	24
2.3.4.2.	Çipura ve Levrek Balıklarının Virüse Maruz Bırakılması.....	25
2.4.	Farklı Hücre Hatlarının VHSV'ne Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	26
3.	BULGULAR.....	28
3.1.	Saha Çalışmaları.....	28
3.2.	Virüs İzolatlarının Tanımlanması.....	31
3.3.	Deneysel Enfeksiyon Çalışmaları.....	32
3.3.1.	Karadeniz Alabalığı (<i>Salmo trutta labrax</i>).....	32

	<u>Sayfa No</u>
3.3.2. Gökkuşığı Alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	35
3.3.3. Kaynak Alabalığı (<i>Salvelinus fontinalis</i>).....	37
3.3.4. Çipura (<i>Sparus aureta</i>).....	39
3.3.5. Levrek (<i>Dicentrarchus labrax</i>).....	40
3.4. Farklı Hücre Hatlarının VHSV'ne Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	42
4. TARTIŞMA.....	44
4.1. VHSV'nün Doğal Balık Türlerinde Yayılımı ve Epidemiyolojisi.....	44
4.1.1. Su Sıcaklığı.....	52
4.1.2. Hayat Evresi.....	53
4.1.3. Stres.....	53
4.1.4. Virüs Suşu.....	58
4.1.5. Beslenme.....	58
4.2. VHSV İzolatlarının Genotiplerinin Belirlenmesi.....	60
4.3. VHSV İe'nin Kültür Balıkları Üzerine Virülensliklerinin Belirlenmesi...	61
4.4. EPC ve BF-2 Hücre Hatlarının VHSV'ne (İe) Duyarlılıkları.....	66
5. SONUÇLAR.....	68
6. ÖNERİLER.....	69
7. KAYNAKLAR.....	71
8. EKLER.....	85

ÖZGEÇMİŞ

Doktora Tezi

ÖZET

VİRAL HEMORAJİK SEPTİSEMİ VİRÜSÜNÜN (VHSV) DOĞU KARADENİZ'DE YAŞAYAN DOĞAL BALIK TÜRLERİNDE YAYILIMI, EPİDEMİYOLOJİSİ ve KÜLTÜR BALIKLARI ÜZERİNE VİRÜLENSİ

Cemil ALTUNTAŞ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Hamdi ÖĞÜT
2015, 85 Sayfa, 8 Ek Sayfalar

Viral Hemorajik Septisemi Virüsü'nün (VHSV) Doğu Karadeniz'de bulunan doğal balık türlerinde yayılımını ve prevalansını belirlemek amacıyla; 2009-2011 yılları arasında 5 farklı istasyondan avlanan 18 farklı türden toplam 5025 adet balık, hücre kültürü kullanılarak viral taramadan geçirildi. Hücre kültüründe görülen sitopatik etkilerin viral aktivite olup olmadıkları RT-PCR ile belirlendi. Tirsi (*Alosa immaculata*), barbunya (*Mullus barbatus*), gelincik (*Gaidropsarus vulgaris*), iskorpit (*Scorpeane porcus*), istavrit (*Trachurus mediterraneus*), mezzit (*Merlangius merlangus euxinus*), kurbağa balığı (*Uranoscopus scaber*), sardalya (*Sardina pilchardus*), zargana (*Belone belone*), kum kayabalığı (*Neogobius melanostomus*), dikenli vatoz (*Raja clavata*) ve hamsi (*Engraulis encrasicolus*) türlerinden VHSV izole edildi. VHSV izole edilen türlerden mezzit, sardalya ve kum kayabalığı dışındaki türlerde VHSV ilk kez bu çalışma ile rapor edildi. Sekans analizleri sonucunda tüm izolatların VHSV genotip-Ie'ye dahil olduğu belirlendi. Karadeniz alabalığı, gökkuşuğu alabalığı kaynak alabalığı, çipura ve levrek balıklarının VHSV-Ie'ye karşı duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla banyo yöntemi uygulanarak deneysel enfeksiyon çalışmaları yapıldı. Deneylerde kullanılan tüm balıkların larval/juvenil dönemde VHSV Ie'ye duyarlı olduğu ve balıklarda %12-34 arasında ölümlere neden olduğu belirlendi. Karadeniz alabalığı %34 ölüm oranı ile VHSV-Ie'ye en duyarlı tür iken bunu sırasıyla levrek %25, çipura %15, gökkuşuğu alabalığı ve kaynak alabalıkları %12 ile takip etti ($\chi^2=16,7$; $P<0,05$). Tüm bu bulgular VHSV-Ie'nin Doğu Karadeniz'de yaşayan doğal balık türlerinde oldukça yaygın olduğunu ve kültür balıkçılığı için kontrol edilmez ise sınırlayıcı bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Doğu Karadeniz'de stok yönetimi ve türlerin yok olmasında VHSV-Ie'nin etkisini belirlemede daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: VHSV, Karadeniz, balık, virülens, alabalık, çipura, levrek

PhD. Thesis

SUMMARY

SURVEY OF VIRAL HAEMORRHAGIC SEPTICEMIA VIRUS (VHSV) IN THE SOUTH-EASTERN BLACKSEA AND THE DETERMINATION OF ITS VIRULENCE ON CULTURED FISH

Cemil ALTUNTAŞ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Fisheries Technology Engineering Graduate Program
Supervisor: Prof. Hamdi ÖĞÜT
2015, 85 Pages, 8 Pages Appendix

A field survey was carried out to determine the distribution and prevalence of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in various wild fish species in the South-Eastern Black Sea region in 2009, 2010, and 2011. The pooled or individual samples of kidney, liver, and spleen of 5025 specimens belonging to 18 fish species, were examined using cell culture. The cells showing cytopathic effects (CPE) were subjected to RT-PCR. Twelve species of fish (Pontic shad *Alosa immaculata*, red mullet *Mullus barbatus*, three-bearded rockling *Gaidropsarus vulgaris*, black scorpionfish *Scorpeane porcus*, Mediterranean horse mackerel *Trachurus mediterraneus*, whiting *Merlangius merlangus euxinus*, stargazer *Uranoscopus scaber*, pilchard *Sardina pilchardus*, garfish *Belone belone*, round goby *Neogobius melanostomus*, thornback ray *Raja clavata* and anchovy *Engraulis encrasicolus*) tested positive for VHSV. Except whiting, pilchard and round goby, the rest are new host records for VHSV. Sequence analysis showed that all isolates belong to VHSV genotype Ie. Fry of three trout species (Black Sea trout (*Salmo trutta labrax*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*), sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*) were challenged by immersion with VHSV-Ie, originally isolated from whiting (*M. merlangus euxinus*) in the Black Sea. VHSV-Ie caused mortality levels between 12 to 34% among the species tested. The most susceptible species was blacksea trout (cumulative mortality, CM = 34%), followed by sea bass (%25), sea bream (%15), rainbow trout (12%) and brook trout (12%) ($\chi^2=16.7$; $P<0.05$), respectively. These results support the hypothesis that VHSV-Ie genotype is highly prevalent among the fish species in the Black Sea, and should be considered in fisheries management.

Key Words: VHSV, black sea, wild fish, virulence, salmonids, sea bass, sea bream

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Örnekleme sahası.....	14
Şekil 2. Enfeksiyon çalışmalarının yapıldığı deney düzeneği.....	23
Şekil 3. Agaroz jelde oluşan bantların görünümü.....	31
Şekil 4. VHSV (Ie) izolatlarının dendogram ağacı.....	32
Şekil 5. Karadeniz alabalıklarında virüs kaynaklı balık ölümleri.....	34
Şekil 6. Karadeniz alabalıklarında görülen VHSV klinik belirtileri.....	34
Şekil 7. Gökkuşuğu alabalıklarında virüs kaynaklı balık ölümleri.....	35
Şekil 8. Gökkuşuğu alabalıklarında görülen VHSV klinik belirtileri.....	36
Şekil 9. Kaynak alabalıklarında virüs kaynaklı balık ölümleri.....	38
Şekil 10. Kaynak alabalıklarında görülen VHSV klinik belirtileri.....	38
Şekil 11. Çipura balıklarında virüs kaynaklı balık ölümleri.....	40
Şekil 12. Levrek balıklarında virüs kaynaklı balık ölümleri.....	42

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Örnekleme istasyonları ve örneklenen balık türleri (Işidan, 2010).....	8
Tablo 2. Termal dönüştürücüde tekrarlanan döngüler.....	22
Tablo 3. VHSV izole edilen balık türleri ve prevalens değerleri.....	29
Tablo 4. Karadeniz Alabalığı ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışması.....	33
Tablo 5. Gökkuşığı alabalığı ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışması.....	36
Tablo 6. Kaynak alabalığı ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışması.....	37
Tablo 7. Çipura balıkları ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışması.....	39
Tablo 8. Levrek balıkları ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışması (1. deney).....	40
Tablo 9. Levrek balıkları ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışması (2. deney).....	41
Tablo 10. Hücre kültürlerinde üretilen virüs miktarları.....	43

SEMOLLER DİZİNİ

BF-2	Bluegill Fry
CPE	Sitopatik Etki
EPC	Epithelioma Populosum Cyprini
MEM	Minimal Essential Medium
RT-PCR	Tersine Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TCID ₅₀	Doku Kültürü Enfektif Doz (%50)
VHS	Viral Hemorajik Septisemi Hastalığı
VHSV	Viral Hemorajik Septisemi Virüsü

1.GENEL BİLGİLER

1.1. Viral Hemorajik Septisemi (VHS)

Viral Hemorajik Septisemi (VHS) ilk kez 1938 yılında “Böbrek Şişkinliği” adı ile tarif edildi (Schäperclaus, 1938). 1946 yılında Polonya’nın güneyinde ve 1950’li yılların başında Danimarka’da bu hastalık “Egtved Hastalığı” (Schäperclaus, 1954; Rasmussen, 1965), Fransa’da ise “Bulaşıcı Anemi” (Besse, 1955) olarak isimlendirildi. Jensen (1963) tarafından bu virüsün alabalık hücre kültüründe ilk kez izolasyonunun yapılmasıyla viral etiyojisi hakkında bilgi edinilmeye başlandı. Aynı yıl yapılan uluslararası balık patolojileri toplantısında bu hastalığa “Viral Hemorajik Septisemi Hastalığı (VHSH)” adı verildi.

Viral Hemorajik Septisemi Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü tarafından en tehlikeli viral balık hastalıkları arasında listelenmektedir (OİE, 2010). Ülkemizde ise Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü’nün 1 Nisan 2004 tarihli ve 2004/14 sayılı tebliğinde ihbarı mecburi hayvan hastalıkları arasında yer almaktadır.

Viral Hemorajik Septisemi’nin (VHS) Avrupa’da kültür balıkçılığına zararı 1991 yılındaki bir çalışmaya göre yaklaşık 40 milyon Pound seviyesindedir (Hill, 1992). Danimarka’da 2000 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada ise gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üretimi yapan iki işletmede görülen VHS salgınlarının sebep olduğu maddi kayıpların yaklaşık 211.000 Avro olduğu tahmin edilmektedir (Skall vd., 2005b).

Viral Hemorajik Septisemi hastalığına sebep olan Viral Hemorajik Septisemi Virüsü (VHSV) deniz balıklarından ilk kez 1979 yılında Yeni Zelanda’nın güney kıyı sularında Atlantik morinası (Atlantic cod, *Gadus morhua*) (Jensen vd., 1979; Jorgensen ve Olesen, 1987), daha sonra 1993 ve 1995 yıllarında İskoçya’nın batı kıyı sularında morina (*Melanogrammus aeglefinus*) balıklarından izole edildi (Smail, 2000). 1988 yılında Amerika’da coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) balıklarının ovaryum sıvılarında bulunmasıyla VHSV Avrupa dışında ilk kez rapor edildi (Brunson vd., 1989; Hopper, 1989). Bu durum araştırmacılarda VHSV’nin daha geniş bir coğrafik alanda

yayılm göstermiş olabileceği fikrini uyandırdı. Nitekim son yıllarda yapılan çalışmalarda, VHSV Kuzey Amerika, Asya ve Avrupa'yı da içine alan kuzey yarım kürede 82 farklı balık türünden izole edildi ve 17 balık türünün de deneysel olarak bu virüse duyarlı olduğu görüldü (Ek tablo 1) (OİE, 2012). Türkiye'de ise ilk kez 2004 yılında Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü (SUMAE) tarafından üretilen kalkan (*Psetta maxima*) balıklarından izole edildi (Kalaycı vd., 2006).

Viral Hemorajik Septisemi Virüsü (VHSV) *Mononegavirales* takımında *Rhabdoviridae* ailesinin *Novirhabdovirus* genusuna ait olup zarflı ve negatif iplikli bir RNA virüsüdür (ICTV, 2000). 180 nm uzunluğunda, 60 nm çapında ve mermi şeklindedir. Tek iplikli RNA içerir (de Kinkelin ve Scherrer, 1970; McAllister, 1979). VHSV genomu yaklaşık olarak 11.200 nükleotid içerir ve 3'-N-P-M-G-Nv-L-5' düzeninde kodlanmış beşi yapısal olan (Nükleoprotein (N), Fosfoprotein (P), Matrixprotein (M), Glikoprotein (G), RNA polimeraz (L)) ve biri henüz fonksiyonu tam olarak bilinmeyen ve yapısal olmayan (Nv Protein) altı proteinden oluştuğu bildirilmektedir (Schutze vd., 1999).

VHSV'nün türünü belirlemede en ayırıcı yol; nükleikasit sekansıdır. Bir çok laboratuvar tarafından yapılan sekans karşılaştırmaları; genetik farklılıkların virüsün izole edildiği yıl veya etkilediği türden ziyade coğrafik bölgeyle ilgili olduğunu ortaya koymaktadır (Skall vd., 2005b). Nükleoprotein ve Glikoprotein sekans analizine dayalı olarak VHSV'nün dört genotipi olduğu bildirilmektedir (Snow vd., 1999). Bunlar;

Genotip I: Avrupa tatlı su izolatları ve Baltık denizi izolatlarının bir kısmını içerir ve beş alt gruba ayrılır. Genotip I-a; Avrupa tatlı su balıklarından izole edilen suşları, genotip I-b; Baltık denizi, Skagerrak, Kattegat, İngiliz kanalı ve Kuzey denizi suşlarını, genotip I-c; Danimarka tatlı su suşlarının bazılarını, genotip I-d; Norveç ve Finlandiya suşlarını ve genotip I-e; Karadeniz suşlarını içerir.

Genotip II: Baltık denizinde Gotland havzası suşları

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

Genotip IV: Kuzey Amerika ve Asya (Kore ve Japonya) suşlarını içermektedir (genotip IV-a; Deniz balıklarından izole edilenler ve genotip IV-b; Tatlı su balıklarından izole edilenler)

VHS salgınları hem deniz hem de tatlı su ortamında görülebilir ve tatlı su ve deniz izolatlarının patojeniteleri arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır (Skall vd., 2005b). VHS salgınlarında su sıcaklığı önemli bir çevresel faktördür. Hastalık daha çok 4-14°C su

sıcaklıklarında görülür. 15°C'nin üzerindeki sıcaklıkların virüsün çoğalması üzerine olumsuz etkileri olduğu bildirilmektedir. Su sıcaklığına bağlı olarak 7–15 günlük bir inkübasyon süresi vardır. Replikasyon için optimum su sıcaklığı 9-12°C ve optimum pH 7,4–7,8'dir. Replikasyon 6°C'de çok azdır ve 20°C'de hiç yoktur (de Kinkelin vd., 1980; Bernard vd., 1983; McAllister, 1990). VHS yılın her mevsiminde gözlenmekle beraber salgınlar genellikle su sıcaklıklarında dalgalanmaların olduğu ilkbahar dönemlerinde daha çok görülür (Acosta vd., 2005).

VHSV partiküllerinin tatlı ve tuzlu su ortamlarında 40 güne kadar enfektivitesini kaybetmeden kalabildiği bildirilmiştir (Snow vd.,2005). VHSV'nün konak dışında hayatta kalması suyun fiziko-kimyasal yapısına ve su sıcaklığına bağlıdır (Ahne, 1982). 20°C ile karşılaştırıldığında 4°C su sıcaklığında VHSV daha uzun süre varlığını koruyabilir. VHSV'nün tatlı su ortamında 4°C'de 28-35 gün, filtre edilmiş tatlı suda ise 1 yıl boyunca enfektivitesini koruduğu bildirilmiştir (Parry ve Dixon, 1997). Ovaryum sıvıları veya kan ürünleri (serum) gibi organik materyallerin suya eklenmesiyle virüs daha uzun süre varlığını sürdürebilir. Yapılan bir çalışmada 15°C su sıcaklığında deniz suyunda 40 saat sonunda virüsün varlığını koruduğu fakat virüs enfektivitesinin 10 saat sonra %50 oranında azaldığı bildirilmektedir (Kocan vd., 2001).

VHSV'ne duyarlılık her balık türünde aynı değildir. Enfeksiyon her yaş grubunda görülebilir fakat genç balıklar yetişkin balıklara göre enfeksiyona daha duyarlıdır. Çevre koşullarına bağlı olarak balık ölümleri %20'den %80'lere kadar çıkabilir, hatta alabalık larvalarında %100 ölümler görülebilir (CFSPH, 2003).

1.1.1. VHS'nin Yayılımı

Kültür balıkları, doğal balıklar ve/veya doğaya geri kaçan/bırakılan balıklardan virüs taşıyanlar ve klinik olarak enfekte balıklar VHSV rezervuarlarını oluşturmaktadır (OİE, 2010). Virüs ikincil solungaç lamelleri ve vücuttaki yaralar vasıtasıyla balığa bulaşır. VHSV tüm yaş gruplarına kolaylıkla bulaşabilir ve hayatta kalan balıklar ömür boyu taşıyıcı hale gelerek üreme sıvısı ve idrar yoluyla virüsü ortama yayarlar. Yumurtlamadan 3–4 saat sonra yumurtalardan virüs izole edilmesine rağmen bu virüsün yumurta ile vertikal bulaşması henüz kanıtlanamamıştır (Jorgensen, 1980; de Kinkelin ve Castric, 1982; Castric ve de Kinkelin, 1984).

VHSV'nün Great-Lakes-st. Lawrence (ABD) nehir sistemine girişi ve yayılımı üzerine yapılan çalışmalar bu virüsün, balast suları ya da göçmen balıklar vasıtasıyla (Elsayed vd., 2006), akuakültür aktiviteleri (Skall vd., 2005b; FRS, 2006), balık yemleri (Goodwin vd., 2004) ve su kuşları vasıtasıyla (Peters ve Neukirch, 1986) nehir sistemine girmiş ve yayılmış olabileceğini göstermektedir.

Kuluçkahane atık sularının deşarj edildiği yerlerdeki cansız objelerden VHSV'nün izole edilmesi ve bu virüsün su içerisinde birkaç gün canlı kalabilmesi enfekte kulukahanelerin virüsün yayılmasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir (de Kinkelin ve Scherrer, 1970).

Diğer viral hastalıklarda olduğu gibi VHS hastalığında da stres patojenite ve epidemileri etkileyen önemli bir faktördür. Enfeksiyonu atlatan balıklarda virüs gizli kalabilir ve ileride gerçekleşebilecek bir stres faktörüyle birlikte virüs saçılımı söz konusu olabilir (Acosta vd., 2005; de las Heras, 2008; Knuessel vd., 2003; Skall vd., 2004b; Snow vd., 2005). Özellikle yüksek stok yoğunluğu, kötü beslenme, yetiştiricilik faaliyetleri, balık taşıma işlemleri vb. durumlara maruz kalan balıklarda artan strese bağlı olarak VHSV'nün dozajı ve hastalığın derecesi artabilir ve bunun sonucunda da önemli miktarda balık ölümleri meydana gelebilir. Optimum yetiştiricilik şartlarında, stres oluşuncaya kadar çok az balık hastalığın belirtilerini gösterir (Jørgensen, 1974; Hershberger vd., 1999).

1.1.2. VHS'nin Klinik Belirtileri

VHS hastalığında, hastalığın şiddetine göre akut, kronik ve latent (taşıyıcı) olmak üzere üç durumdan herhangi birisi görülebilir ve her bir hastalık tipinde farklı klinik belirtiler görülebilir (Yasutake, 1970; Wolf, 1988). Akut tipte, tipik olarak ani ve yoğun ölümler görülür. Balıklarda uyuşukluk, renkte koyulaşma, ekzoftalmus ve kansızlık görülebilir. Gözlerde, deride, solungaçlarda ve yüzgeç kaidelerinde hemoraji (kanamalar) görülebilir. Göz çevresinde, iskelet kaslarında ve iç organlarda nokta şeklinde kanamalar görülebilir. Karaciğerde yer yer renk farklılaşmaları ile birlikte şişkinlik ve kan toplanması vardır. Böbrekler kırmızı renkte ve incelmiştir. Kronik olarak enfekte olmuş balıklarda önemli derecede yoğun ölümler görülür fakat ölümler akut tipe göre daha uzun zamana yayılmıştır. Balıklarda uyuşukluk, renkte koyulaşma, ekzoftalmus ve şiddetli kansızlık görülebilir. Hemoraji de görülebilir fakat şiddetli değildir. Karaciğer, dalak ve böbreğin ödemine bağlı olarak karın şişkindir. Karaciğer soluktur ve petek şeklinde kızarıklıklar

vardır. Latent enfeksiyonda ise ölüm oranı düşüktür ve balık normal görünümündedir fakat hiperaktif olabilir (McAllister, 1990).

1.1.3. VHS'nin Teşhisi ve Viral Örnekleme Yöntemi

Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (O.İ.E.) ve Avrupa Topluluğu (2001/183/EC) VHS'nin teşhis ve teyidi için örnekleme planları ve teşhis yöntemleri hakkında direktifler yayımlamıştır (OİE, 2006; EC, 2001). Buna göre, viral örnekleme için 2,5 cm boyunda veya daha küçük balıklarda varsa besin kesesi çıkarılır ve balığın tamamı kullanılır. 2,5–4 cm boyundaki balıklarda baş ve kuyruk çıkarılır, 4–7 cm boyundaki balıklarda tüm iç organlar kullanılır ve 7 cm den büyük balıklarda böbrek, dalak ve/veya beyin kullanılır. Damızlık dişi balıklarda böbrek, dalak ve ovaryum sıvısı kullanılırken erkeklerde böbrek ve dalağın kullanılma imkânı olmadığından sperm sıvısı kullanılabilir (NWFHS, 2001). Her bir havuzdan 1–5 balık alınarak içerisinde taşıma sıvısı (Earl's Minimal Essential Medium, Earl's Balanced Salt Solution, Tris-Buffer, NaHCO₃, L-glutamin, Gentamicin) bulunan steril plastik tüplere konulur. Steril plastik tüplerin üzerine örnek miktarı, örneğin alındığı yer, örnek tipi, tarih, balık türü vb. bilgiler yazılır. Örnekler, yalıtılmış bir kutu (saklama kabı, strafor gibi) içerisinde ve soğuk muhafaza edilerek en kısa zamanda laboratuara ulaştırılmalıdır. Taşıma sırasında örneklerin donmamasına, ısınmamasına (10°C den daha soğuk olmalı) ve güneş ışığından korunmasına dikkat edilmelidir. Örnekleme yapıldıktan sonra en geç 48 saat içerisinde örnekler hücre kültürüne inoküle edilmelidir.

VHS'nin standart teşhisi virüsün hücre kültüründe izolasyonu ile yapılır. VHSV; BF-2 (Bluegill Fry: Wolf vd., 1966), CHSE-214 (Chinook Salmon Embryo: Lannan vd., 1984), RSBK-2 (Red Sea Bream Kidney: Kusuda ve Kawarasaki, 1993), EPC (Epithelioma Populosum Cyprini: Tomasec ve Fijan, 1971), FHM (Fathead Minnow: Gravell ve Malsberger, 1965), RTG-2 (Rainbow Trout Gonad : Wolf ve Quimby, 1962), AS (Atlantic salmon: Nicholson ve Byrne, 1973), SSN-1 (Striped snakehead: Frerichs vd., 1991) ve FSP (Flounder Spleen: Kang vd., 2003) gibi çeşitli hücre hatlarında ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve sazangillerin yumurtalarında çoğaltılabilir (McAllister, 1979; de Kinkelin, 1983). Bunlar arasından VHSV izolasyonu için en duyarlı olanı BF-2 hücre hattıdır (Olesen ve Jorgensen, 1992). Virüsün hücre kültüründe replikasyonu için optimum sıcaklık 14–15°C'dir (de Kinkelin ve Scherrer, 1970). Hidrojen iyon konsantrasyonu (pH) viral

replikasyonu oldukça etkiler ve pH 7,4–7,8 şartları teşhis için mutlaka sağlanmalıdır (Campbell ve Wolf, 1969; Wolf ve Quimby, 1973).

Laboratuara ulaştıktan sonra balıklardan alınan organ homojenatları 2000-3000 x g - 4°C - 20 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonucu elde edilen süpernetant yeni bir santrifüj tüpüne aktarılır ve buradan da inokulum hacmi ile hücre kültürü medyumu arasındaki oran 1:10 ve 1:100 olacak şekilde 24 saatte %90 kaplanmış hücrelere virüs inoküle edilir. Hücre kültürüne inoküasyondan sonra 7–14 gün boyunca her gün ya da iki günde bir ters ışık mikroskobu ile sitopatik etki (CPE) oluşumu gözlemlenir. Sitopatik etki, viral enfeksiyona bağlı olarak doku kültürü hücrelerinde metabolik ve morfolojik değişiklikler olarak tanımlanır ve hücre kültüründe üzüm salkımı gibi yuvarlak tanecikler şeklindeki bir görünüş VHSV için karakteristiktir. Eğer hücre kültüründe CPE oluşmuş ise tanımlama aşamasına geçilebilir. CPE oluşmamış ise subkültivasyonla taze hücre kültürleri kullanılarak inokülasyon işlemi tekrarlanır ve 7–14 günlük inkübasyon süresi sonucunda hala CPE oluşmamışsa sonuç negatiftir denilebilir (O.İ.E., 2006; E.C., 2001).

VHS'nin tanımlanması için Nötralizasyon, Florasan Antikor, Komplement Fiksasyon, İmmun Presipitasyon, Counter Current İmmun Elektroferez, İmmunblot, ELİSA, Elektron Mikroskobu ve Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR) gibi çeşitli yöntemler kullanılabilir (Ahne, 1981; de Kinkelin, 1983; McAllister ve Schill, 1986; Way ve Dixon, 1988; Zwillenberg vd., 1965). İnoküle edilmiş hücre kültürlerinde viral antijenin tespiti İndirek Florasan Antikor (IFAT) ve İmmun Peroksidaz (IP) boyama yöntemleriyle yapılabilir (Meier ve Jørgensen, 1975; Faisal ve Ahne, 1980).

1.1.4. Tedavi

VHS'nin henüz bilinen bir tedavisi yoktur ve hastalıktan kaçınma (virüs ile konak arasındaki temasın önlenmesi) hastalığın kontrolünde en etkili yöntemdir (Ghittino, 1965). VHSV hücre ortamı dışında eter, gliserol, formaldehit, kloroform, sodyum hipoklorit, sodyum hidroksit, iyodofor gibi dezenfektanlarla etkisiz hale getirilebilir (McAllister, 1990).

Kuluçkahane dezenfeksiyonu ve bununla birlikte patojen içermediği bilinen yumurta veya balıklarla yeniden stok oluşturma hastalığın önlenmesinde başarılı olmuştur (Kehlet, 1973; Jørgensen, 1974; 1980). Kuluçkahane giriş suyunun kontrolü hastalık etmeni olan mikroorganizmaların kuluçkahaneye girişini minimuma indirmede önemli rol

oynamaktadır. Bu kontrolü sağlamak için birçok yöntem kullanılabilir fakat kısa dalga boylu ultraviyole ışıklar gerek tek başına gerekse diğer dezenfektanlarla birlikte en çok kullanılan yöntemdir. Ultraviyole ışıklar dalga boylarına göre UVA (320–400 nm), UVB (280–320 nm) ve UVC (200–280 nm) olmak üzere 3'e ayrılır ve bunlardan UVC en antiseptik etkiye sahip olanıdır. UVC kullanımının şimdiye kadar bilinen bir yan etkisi yoktur ve bakteri ve virüslerin inaktivasyonunda oldukça etkili bir yöntemdir (Kurth vd., 1999). Temel olarak UVC, DNA ve RNA üzerinde biyolojik bir etkiye sahiptir. Aralarında VHSV'nünde bulunduğu bazı RNA virüslerinde genomlarda kırılmalara ya da mutasyona neden olarak urasil ünitelerinin dimerizasyonuna yol açarlar ve böylece bu virüslerin inaktivasyonu gerçekleşir (Smirnov vd., 1991). Su sıcaklığında yapılan manipülasyonlarla hastalığın etmeni olan VHS virüsü etkisiz hale getirilebilir. Sıcaklık manipülasyonlarının yanı sıra pH'nın <2,5 ve >12,2 değerlerinde VHSV etkisiz hale gelmektedir (CFSPH, 2003).

1.2. Önceki Yapılan Çalışmalar

VHSV Karadeniz'de ilk kez Gürcistan'da gökkuşaağı alabalıklarında rapor edilmiş ve Genotip Ie içerisine yerleştirilmiştir (Einer-Jensen vd., 2005).

VHSV, Türkiye'de ilk kez Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü (SUMAE) tarafından üretilen ve doğadan yakalanan kalkan (*Psetta maxima*) balıklarından izole edildi (Kalaycı vd., 2006; Nishizawa vd., 2006). Bu balıklardan izole edilen VHSV'nün Gürcistan'da alabalıklardan izole edilen GE-1.2 izolatına % 98 benzerlik gösterdiği ve aynı genogrupta (Genotip I-e) yer aldığı belirlendi. Bu izolatlarla yapılan deneysel bir çalışmada, 15 günlük (5 cm boyunda) kalkan balığı larvaları ve 146 günlük (4 cm boyunda) gökkuşaağı alabalığı yavruları, VHSV'ne banyo ve enjeksiyon yöntemleriyle maruz bırakıldı. Çalışma sonucunda VHSV izolatlarının kalkan balıkları için düşük patojenite gösterdiği, gökkuşaağı alabalıkları için ise patojenik olmadığı belirtildi (Nishizawa vd., 2006).

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yapılan diğer bir çalışmada, 2007 ve 2008 yıllarında VHSV'nün deniz kafeslerinde kültürü yapılan gökkuşaağı alabalıklarında (*O. mykiss*) ve doğadan avlanan mezzit (*M. merlangus euxinus*) balıklarında yayılımı ve mevsimselliği izlendi. Bu çalışmada, alabalıklarda VHSV'ne rastlanmazken, mezzit balıklarından Ocak-Nisan ayları arasında VHSV izole edildi (Altuntaş, 2007; Altuntaş ve Öğüt, 2010).

Bölgede yapılan diğer bir çalışmada ise Karadeniz’de yaşayan doğal balık türlerinden VHSV izolasyonu ve izole edilen virüslerin patojenitelerinin belirlenmesi amacıyla 12 farklı balık türünde (3378 adet) ve tatlı sularda yetiştiriciliği yapılan alabalıklarda VHSV taraması yapıldı ve sadece kalkan balıklarından bu virüsün izole edildiği bildirildi (Işıdan, 2010). Bu çalışmadaki örnekleme istasyonları ve örneklenen türler hakkında ayrıntılı bilgi Tablo 1’de sunulmaktadır.

Tablo 1. Örnekleme istasyonları ve örneklenen balık türleri (Işıdan, 2010).

Tür	Hopa	Pazar	Trabzon	Giresun	Ordu	Samsun	Sinop	İnebolu	Ereğli
Palamut	-	-	37	10	-	-	-	-	-
Hamsi*	112	143	350	55		89	34	75	47
Çipura	-	-	-	-	27	-	-	-	-
Levrek	-	-	-	-	36	-	-	-	-
İzmarit*	-	201	160	20		17	-	-	-
İstavrit*	-	110	260	34	30	37	76	30	25
Barbunya*	-	165	70	32	65	43	59	33	25
Mezgit*	95	90	182	78	23	74	105	28	39
Vatoz*	-	-	58	-	-	-	-	-	-
Trakonya	-	-	65	-	-	-	-	-	-
Minekop	-	-	10	-	-	-	-	-	-
Kalkan	-	-	24	-	-	-	-	-	-
Toplam	207	709	1216	229	181	260	274	166	136

(*: Hem bu çalışmada hemde Işıdan (2010) tarafından yapılan çalışmada örneklenen balık türleri)

Ülkemizde balık hastalıkları konusunda ulusal referans laboratuvar olan Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü’nün Viroloji Bölümü tarafından, IPN (İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozu) ve VHS hastalıkları yönünden 2004-2011 yılları arasında yapılan rutin teşhis, hastalık kaynağını araştırma amaçlı epidemiyolojik tarama, bölgelerin bu hastalıklar açısından durumlarının belirlenmesi amaçlı epidemiyolojik tarama ve hastalık sonrası

izleme çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalarda, gökkuşuğu alabalıklarından (*O. mykiss*) 2006 ve 2007 yıllarında Bolu'da, kalkan balıklarından (*Psetta maxima*) 2004 ve 2009 yıllarında Trabzon ve Muğla illerinde, levrek (*D. labrax*) balıklarından 2004 yılında Antalya, Muğla ve İzmir illerinde ve çipura balıklarından (*S. aurata*) 2004 yılında İzmir'de VHSV izolasyonları gerçekleştirildi. Gökkuşuğu alabalığı ve kalkan balıklarından elde edilen izolatların genotip-I oldukları belirlendi. (Kalaycı vd., 2012)

King vd. (2001b) yaptığı çalışmada, Kuzey Denizi, Kuzey-Doğu Atlantik Okyanusu ve İrlanda kıyı sularında doğal balık stoklarında VHSV'nün dağılımını belirlemek amacıyla yaptıkları 6 örnekleme gezisinde aralarında mezzit (*Merlangius merlangus*), çaça (*Sprattus sprattus*), istavrit (*Trachurus trachurus*) ve gelincik (*Rhinonemus cimbrius*) balıklarında bulunduğu 23 farklı balık türünden toplam 19 293 adet balık örneklendi ve Cod (*Gadus morhua*), poor cod (*Trisopterus minutus*), norway pout (*Trisopterus esmarkii*) ve mezzit (*Merlangius merlangus*) balıklarından VHSV izole edildi. Çalışmada, 1 grupta 10 adet mezzit olacak şekilde viral örnekleme yapıldı ve toplam 3424 adet mezzit 350 grupta viral örneklendi. Bu gruplardan yalnızca 1 tanesinden VHSV tespit edildi. VHS virüsü tespit edilen gruptaki mezzit balıklarının ortalama boyları $11,3 \pm 1,1$ cm olarak ölçüldü. Aynı çalışmada, 1704 adet çaça 176 grupta, 30 adet istavrit 3 grupta ve 121 adet gelincik 68 grupta viral örneklendi ve bu örneklerde VHSV'ne rastlanmadı.

Dixon vd. (2003), İngiltere'yi çevreleyen deniz sularından örneklemediği ve aralarında mezzit (*Merlangius merlangus*), çaça (*Sprattus sprattus*) ve istavrit (*Trachurus trachurus*) balıklarında bulunduğu 11 farklı balık türünde VHSV taraması yaptılar ve bu balıklardan sadece ringa (*Clupea harengus*) balıklarından bu virüsü izole ettiler.

Mortensen vd. (1999), 1996-97 yıllarında Danimarka'yı çevreleyen denizlerde VHSV'nün yayılımını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada aralarında mezzit (*Merlangius merlangus*), istavrit (*Trachurus trachurus*), gelincik (*Rhinonemus cimbrius*), çaça (*Sprattus sprattus*) ve zargana (*Belone belone*) balıklarının da bulunduğu 29 farklı balık türünden toplam 7344 adet balığı 923 grupta viral örneklediler ve 8 farklı türden toplam 31 adet VHSV izolasyonu gerçekleştirdiler (herring (11 izolat), çaça (8 izolat), cod (6 izolat), gelincik (1 izolat), Norway pout (1 izolat), Blue whiting (1 izolat), mezzit (2 izolat) ve Lesser argentine (1 izolat)). Bu türlerden cod ve herring balıkları dışındaki türler ilk kez bu çalışma sonucunda rapor edildi.

Brudesth ve Evensen (2002), Norveç kıyı sularında yaptıkları bir çalışmada, aralarında çaça (*Sprattus sprattus*, 440 adet), mezzit (*Merlangius merlangus*, 18 adet),

gelincik (*Rhinonemus cimbrius*, 25 adet), istavrit (*Trachurus trachurus*, 17 adet), Gobitler (*Gobiusculus flavescens*, *Pomatoschistus minutus*, *Gobius niger*, *Pomatoschistus pictus*, *Aphya minuta*, *Crystallogobius linearis*, toplam 1300 adet), dil (*Solea vulgaris*, 2 adet) ve pisi (*Platichthys flesus*, 8 adet), balıklarında olduğu 16 farklı familyadan toplam 40 farklı balık türü (8395 adet balık/954 grup) viral örneklendi ve sadece Blue Whiting (*Micromesistius poutassou*, 2052 adet balık örneklendi, 1 grupta VHSV izole edildi) ve Norway Pout (*Trisopterus esmarkii*, 420 adet örneklendi, 1 grupta VHSV izole edildi) balıklarından alınan organ homojenatlarından VHSV izole edildi.

Hedrick vd. (2003) Kuzey Amerika'da yaptıkları bir çalışmada sardalya, uskumru, Herring, Sablefish, ratfish, Shiner perch, Eulachon, Surf smelt balıklarında VHS virüsü taraması yapıldı ve ratfish hariç diğer tüm balıklardan VHSV izole edildi.

Takano vd. (2000), doğadan avladıkları ve ağırlıkları 500-1000 g arasında değişen 113 adet pisi (*Paralichthys olivaceus*) balığı üzerinde virüs taraması yaptılar ve 2 balıktan VHSV izolasyonu gerçekleştirdiler. Bu iki balıktan birincisinde (661 g) VHS'nin herhangi bir belirtisine rastlanmazken diğer balığın (1000 g) ise anemik (hematokrit değeri: %16,5) olduğu görüldü. VHSV bu çalışma ile Asya kıtasından ilk kez rapor edildi.

Kim vd. (2009), Kore'nin güney kıyılarında 2005 yılında kış-bahar ayları arasında (su sıcaklığı 9-15°C) üç farklı işletmede kültürü yapılan pisi balıklarında (*Paralichthys olivaceus*) günlük % 0,5-3 arasında (kümülatif ölümler %40-60) balık ölümleri görülmesi üzerine yaptıkları bir çalışmada, balıklarda her hangi bir parazit ya da bakteriye rastlanmazken balıklardan alınan organ homojenatlarının hücre kültürüne inokülasyonları sonucunda VHSV'nin karakteristik sitopatik etkileri görüldü. Yapılan sekans analizleri sonucunda VHSV olduğu ve Japonya'da pisi balıklarından izole edilen VHSV ile %99,3-%100 benzerlik gösterdiği belirlendi. Pisi balıklarından izole edilen bu VHSV izolatu ile yine pisi balıklarıyla yapılan deneysel enfeksiyon çalışmalarında 18 gün sonunda banyo yöntemi ile % 60, enjeksiyon yöntemiyle ise %100 balık ölümleri görüldü.

Meyers vd. (1999), Lisianski koyu (Pelican/Alaska) ve etrafındaki sularda yoğun balık ölümlerinin olduğu bir salgın görülmesi üzerine yaptıkları bir çalışmada, bölgeden toplanan ölü balıklardan (Pasifik herring (*Clupea pallasii*), Pasifik hake (*Merluccius productus*) ve Walleye pollock (*Theragra chalcogramma*)) aldıkları numuneleri viral örnekletiler. Örneklerin BF-2 ve EPC hücre hatlarında sitopatik etki gösterdiğini, elektron mikroskopu incelemesinde rhabdovirus olduğunu ve polimer zincir reaksiyonu (PCR)

işlemi sonrasında da Kuzey Amerika kökenli VHSV olduğunu belirlediler. Bu türlerden pasifik hake ve wolleye pollock balıklarından VHSV izolasyonu bölgede ilk kez yapıldı.

2006 yılı Mayıs ayı başlarında New York Çevre Koruma Departmanı (NYSDEC) St. Lawrence nehri ve Lake Ontario bölgelerinde aralarında binlerce kumkayası balığının (*N. melanostomus*) bulunduğu yoğun balık ölümlerinin olduğunu rapor etti. Bölgeden alınan ölü ve ölmek üzere olan kumkayası balıklarında yapılan virolojik muayenelerde organ homojenatlarının FHM hücre hattına inokülasyonları sonucu beşinci günde sitopatik etkilerin (CPE) belirmeye başladığı görüldü. CPE görülen flaklardan alınan sıvılar ile ters transkriptaz polimer zincir reaksiyonu (RT-PCR) yapıldı ve bu örneklerde VHSV olduğu tespit edildi. Sekans analizleri sonucunda izole edilen virüsün genotip-IVb'ye dahil olduğu belirlendi (Grocock vd.,2007).

Skall vd. (2004a) yaptıkları bir çalışmada, gökkuşuğu alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) (0,6-6,2 g) immersiyon (banyo) ve enjeksiyon yöntemleriyle doğal deniz balıklarından izole edilen 139 adet (115 adet Avrupa denizlerindeki doğal balıklardan, 2 adet İskoçya ve İrlanda'da kültürü yapılan kalkan balıklarından, ve 22 adet kültürü yapılan gökkuşuğu alabalıklarından) VHSV'ne karşı duyarlılıkları belirlendi. Çalışma sonucunda, doğal deniz balıklarından izole edilen VHS şuşları ile banyo yöntemiyle yapılan deneysel enfeksiyon çalışmalarında balık ölümleri görülmezken enjeksiyon yöntemiyle yapılan deneysel enfeksiyon çalışmalarında ise bazı izolatların ölümlere neden olduğu görüldü. Kültürü yapılan gökkuşuğu alabalıklarından izole edilen tüm izolatların banyo yöntemiyle yapılan deneysel enfeksiyonlarda önemli derecede ölümlere neden olduğu görüldü. Kültürü yapılan kalkan balıklarından elde edilen 2 izolat ile yapılan deneysel enfeksiyonlarda ise balık ölümleri görülmedi.

Snow ve Smail (1999) yaptıkları bir çalışmada, kalkan balıklarından izole edilen VHSV (860/94-İskoçya) suşu kullanılarak yine kalkan balıkları ile (8 g) 10°C su sıcaklığında immersiyon, enjeksiyon ve kohabitasyon yöntemleri uygulanarak deneysel enfeksiyon çalışmaları yapıldı. Enjeksiyon yöntemiyle yapılan deneysel enfeksiyon çalışmasında balık ölümleri 3. günde başladı ve 13. günde ölüm oranı % 100'e ulaştı. Kohabitasyon yöntemi uygulanan balıklarda ölümler 12. günde başladı ve deney sonunda ölüm oranının % 50-67 ye ulaştığı görüldü. İmmersiyon yöntemi uygulanan balıklarda ise balık ölümleri 9-13 günler arasında görüldü ve ölüm oranı % 63-74 olduğu görüldü.

Goodwin ve Merry (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, mavi solungaç balıkları (*Lepomis macrochirus*) 10-30°C arasında değişen 6 farklı sıcaklıkta VHSV genotip-IVb

kullanılarak intraperitoneal enjeksiyon yöntemiyle deneysel enfeksiyon çalışması yapıldı. Çalışma sonucunda, 10°C su sıcaklığında yapılan deneyde balıkların % 90, 14°C de % 35, 18°C de % 10 oranlarında öldüğü ve 22-30°C de yapılan deneysel çalışmalarda ise balık ölümlerinin olmadığı görüldü.

Schütze vd. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, VHSV Fil3 (Almanya'da gökkuşağı alabalığından izole edilen F1 straini) suşunun tüm genom analizi yapıldı. 3'-N-P-M-G-Nv-L-5' şeklinde dizilen genomun nükleotid büyüklüklerini belirlendi. Buna göre proteinlerin başlangıç ve bitiş noktalarının; Nükleoprotein (N) 168-1382, Fosfoprotein (P) 1481-2149, Matrixprotein (M) 2268-2873, Glikoprotein (G) 2926-4482, Nv Protein 4557-4925 ve RNA polimeraz (L) 5053-11007 olduğu belirlendi.

Lorenzen vd. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, 11 farklı referans laboratuvarı tarafından izole edilen 3 farklı patojenik balık virüsünün (VHSV; genotip-I ve genotip-III, IPNV; serotip Sp ve IHNV) 5 farklı hücre hattında (BF-2, EPC, CHSE-214, FHM ve RTG-2) duyarlılıkları karşılaştırıldı. Sonuç olarak; VHSV izolasyonu için BF-2 ve RTG-2 hücre hatlarının aynı duyarlılıkta olduğu ve diğer hücre hatlarından çok daha fazla duyarlılık gösterdiği, IHNV'nün izolasyonu için EPC ve FHM hücre hatlarının ve IPNV virüsünün izolasyonu için BF-2 ve CHSE-214 hücre hatlarının en iyi sonucu verdiği belirlendi.

Olesen ve Jorgensen (1992), BF-2, EPC ve CHSE-214 balık kökenli hücre hatlarının Danimarka'da tatlı suda yetiştiriciliği yapılan alabalıklarından izole edilen VHSV'ne karşı duyarlılıkları ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, bu virüse en duyarlı hücre hattının BF-2 olduğu ve bu hücre hattının CHSE-214 hücre hattından 10 kat ve EPC hücre hattından 20 kat daha duyarlı olduğu belirlendi.

Isshiki vd. (2001), 1996 yılının bahar aylarında (su sıcaklığı 8-15°C) Japonya'da pisi (*Paralichthys olivaceus*) balığı yetiştiriciliği yapan iki işletmede % 50-70'lere kadar varan balık ölümleri görülmesi üzerine bir çalışma yaptılar. Ölmek üzere olan balıklardan 11 adet (295-575 g) alarak ölüm sebeplerini belirlemeye çalıştılar. Yaptıkları incelemeler sonucunda ölüm sebebinin VHSV (KRRV-9601) olduğunu belirlediler. Balıkların dalaklarından aldıkları organ parçacıklarını 6 farklı hücre hattına inoküle ettiler ve 10-20°C sıcaklıkta inkübe ettiler. 20°C de 14 gün inkübe edilen inokulumlarda en yüksek virüs titresi RSBK-2 (8,80) hücre hattında görülürken bunu sırasıyla FHM (8,05), BF-2 (7,55), CHSE-214 (4,55), RTG-2 (3,80) ve EPC (1,80) hücre hatlarının takip ettiği belirlendi. Aynı çalışmada, 3 farklı büyüklükteki (küçük (14 g), orta (124 g) ve büyük (1059 g)) pisi balıklarını 10±1°C su sıcaklığında 15-60 gün süreyle KRRV-9601 izolatına maruz

birakarak bir deneysel enfeksiyon çalışması yaptılar. 60 gün boyunca kontrol tanklarında balık ölümü görülmezken küçük balıkların olduğu grupta (15. gün sonunda) ve orta boy balıklarda (24. gün sonunda) % 100 balık ölümleri görüldü. Büyük balıkların olduğu grupta ise kümülatif balık ölümlerinin % 60 olduğu görüldü.

1.3. Çalışmanın Amacı/Amaçları

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde VHSV sadece Yomra koyundan avlanan kalkan ve mezigit balıklarından rapor edildi. Dolayısıyla Yomra koyu ve bu iki tür haricinde herhangi bir bölgede doğal balık stoklarında bu virüsün mevcut olup olmadığı konusunda henüz bir bilgi bulunmamaktadır.

Kalkan ve mezigit balıkları ile yapılan çalışmalarda incelenen balıklarda VHS'nin herhangi bir klinik belirtisine rastlanılmadı. Bu durum her iki türün VHSV'nün taşıyıcısı oldukları düşüncesini güçlendirmektedir. VHS'nin gerçek konak türlerinin belirlenmesi amacıyla daha fazla türün örneklenmesi gerekmektedir. Virüsün gerçek konak türlerinin belirlenmesi ile de denizlerimizde bu virüsün yayılımı hakkında fikir sahibi olunabilecektir.

Karadeniz'de alabalık (GE1.2), mezigit (MM1207) ve kalkan (TR-SW13G ve TR-Bs13/15H) VHSV izolatlarının genotip-1e'ye dahil olduğu bildirilmektedir ve bu durum Karadeniz'de tek bir VHSV genotipi olduğu izlenimini vermektedir. Birçok balık türünde VHSV taraması yapılarak farklı suşların varlığı/yokluğu araştırılabilecektir.

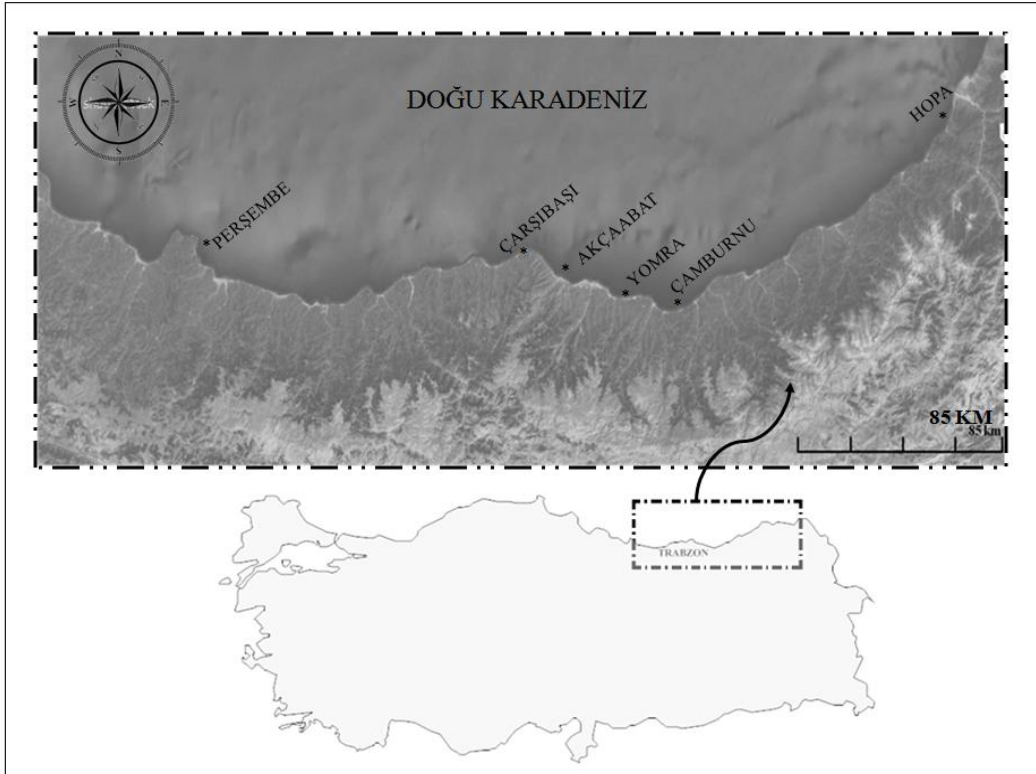
VHSV'nün tatlı su ve deniz izolatlarının patojeniteleri arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır. Doğal balıklardan izole edilen farklı VHSV suşlarının farklı balık türlerinde virülansı ve türler arasındaki enfeksiyon transferlerinin belirlenmesi gerek doğal balık popülasyonları ve gerekse kültür balıkçılığı açısından son derece önemlidir.

Bu çalışma; Doğu Karadeniz Bölgesi'nde seçilen farklı istasyonlarda, bir çok balık türünde VHSV taraması yapılarak 1) bu virüse duyarlı balık türlerinin tespit edilmesi ve virüsün kaynağının (gerçek konak türlerin) belirlenmesi, 2) eğer varsa farklı virüs genotiplerinin belirlenmesi, 3) yoğun olarak kültürü yapılan alabalıklar (gökkuşluğu alabalığı, kaynak alası ve Karadeniz alası), çipura ve levreklerde deneysel enfeksiyon çalışmaları yapılarak bu türlerin VHSV'ne duyarlılıklarının belirlenmesi ve 4) hangi hücre hattının VHSV'ne daha duyarlı olduğunun belirlenmesi amaçlarıyla yapıldı.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Saha Çalışmaları

2009-2011 yılları arasında 5 farklı istasyondan (Şekil 1) toplam 18 farklı balık türü viral olarak örneklendi. Örnekleme yapıldığı istasyonlar, örneklenen balık türleri ve sayıları Ek Tablo 2’de görülmektedir. Araştırmada örneklenen balıklardan hamsi ve çaça balıkları Vakfikebir-Hopa arasında gırgır avcılığı yapan teknelerden temin edilirken diğer balık türleri olta ve dip ağları ile avlandı. Canlı olarak örneklenen balıklar, içerisinde buz bulunan strafor kutulara konularak aynı gün Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Viroloji ve Balık Hastalıkları Laboratuvarı’na ulaştırıldı ve balıkların bir kısmı bireysel olarak (bir grupta tek bir balık) bir kısmı ise gruplar halinde (bir grupta 3-5 balık) viral muayene edildi.



Şekil 1. Örnekleme sahası (Akçaabat: 41° 01' 36"N - 39° 33' 56" E, Çamburnu: 40° 55' 16"N - 40° 11' 25" E, Çarşıbaşı: 41° 04' 19" N - 39° 20' 4" E, Hopa: 41° 24' 44"N - 41° 25' 49" E, Yomra: 40° 57' 45" N - 39° 52' 4" E, Perşembe: 41° 04' 58" N- 37° 46' 40" E)

2.1.1. Örneklenen Balık Türleri

2.1.1.1. Barbunya (*Mullus barbatus*, Linnaeus, 1758)

Akçaabat ve Çamburnu istasyonlarından 2009 (21 adet/5 grup), 2010 (248 adet/54 grup) ve 2011 (192 adet/41 grup) yılları Aralık-Mart ayları arasında boyları 9,4-21,8 cm ve ağırlıkları 8,0-107,77 g arasında değişen toplam 461 adet barbunya 100 grupta viral örneklendi.

2.1.1.2. Çaç (Sprattus sprattus phalericus, Risso, 1827)

Çamburnu ve Hopa istasyonlarından 2010 (140 adet/15 grup) ve 2011 (112 adet/16 grup) yılları Aralık-Şubat ayları arasında boyları 5,9-11,6 cm ve ağırlıkları 1,1-11,58 g arasında değişen toplam 252 adet çaça 31 grupta viral örneklendi.

2.1.1.3. Çinekop (*Pomatomus saltatrix*, Linnaeus, 1766)

Akçaabat ve Çamburnu istasyonlarından 2009 (5 adet/3 grup), 2010 (6 adet/2 grup) ve 2011 (18 adet/7 grup) yılları Aralık-Mart ayları arasında boyları 13,1-23,6 cm ve ağırlıkları 19,0-138,18 g arasında değişen toplam 29 adet çinekop 12 grupta viral örneklendi.

2.1.1.4. Dikenli Vatoz (*Raja clavata*, Linnaeus, 1758)

Akçaabat, Çamburnu ve Çarşıbaşı istasyonlarından 2009 (50 adet/50 grup) ve 2010 (20 adet/19 grup) yılları Aralık-Nisan ayları arasında boyları 14,1-92,0 cm arasında değişen toplam 70 adet dikenli vatoz 69 grupta viral örneklendi.

2.1.1.5. Dil Balığı (*Solea sp.*)

Akçaabat ve Çamburnu istasyonlarından 2009 (5 adet/1 grup), 2010 (13 adet/5 grup) ve 2011 (10 adet/5 grup) yılları Aralık-Mart ayları arasında boyları 13,8-24,6 cm ve

ağırlıkları 20,0-150,07 g arasında değişen toplam 28 adet dil balığı 11 grupta viral örneklendi.

2.1.1.6. Gelincik (*Gaidropsarus vulgaris*, Cloquet, 1824)

Akçaabat ve Çamburnu istasyonlarından 2009 (5 adet/1 grup), 2010 (45 adet/16 grup) ve 2011 (17 adet/17 grup) yılları Aralık-Mart ayları arasında boyları 16,5-26,1 cm ve ağırlıkları 31,85-123,09 g arasında değişen toplam 67 adet gelincik balığı 34 grupta viral örneklendi.

2.1.1.7. Kömürcü Kayası (*Gobius niger*, Linnaeus, 1758) ve Kum Kayası (*Neogobius melanostomus*, Pallas, 1814)

Akçaabat ve Çamburnu istasyonlarından 2009 (6 adet/1 grup), 2010 (29 adet/14 grup) ve 2011 (111 adet/23 grup) yılları Aralık-Mart ayları arasında boyları 11,0-31,6 cm ve ağırlıkları 13,7-327,00 g arasında değişen toplam 146 adet kayabalığı (kum kayası ve kömürcü kayası balıkları) 38 grupta viral örneklendi.

2.1.1.8. Hamsi (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758)

Akçaabat, Çamburnu, Çarşıbaşı ve Hopa istasyonlarından 2010 (318 adet/36 grup) ve 2011 (268 adet/39 grup) yılları Ocak-Mart ayları arasında boyları 7,1-14,5 cm ve ağırlıkları 2,31-16,85 g arasında değişen toplam 586 adet hamsi 75 grupta viral örneklendi.

2.1.1.9. İskorpit (*Scorpaena porcus*, Linnaeus, 1758)

Akçaabat ve Çamburnu istasyonlarından 2010 (51 adet/14 grup) ve 2011 (113 adet/29 grup) yılları Aralık-Mart ayları arasında boyları 9,5-24,5 cm ve ağırlıkları 14,00-369,52 g arasında değişen toplam 164 adet iskorbite 43 grupta viral örneklendi.

2.1.1.10. İstavrit (*Trachurus mediterraneus*, Steindachner, 1868)

Akçaabat, Çamburnu ve Hopa istasyonlarından 2009 (96 adet/19 grup), 2010 (326 adet/85 grup) ve 2011 (257 adet/54 grup) yılları Aralık-Mart ayları arasında boyları 7,7-23,8 cm ve ağırlıkları 3,23-118,2 g arasında değişen toplam 679 adet istavrit 158 grupta viral örneklendi.

Ayrıca, 2009 yılında gırgır ağı ile avlanan ve Ordu ili Perşembe ilçesi açıklarında kafeslerde stoklanan istavrit balıklarından boyları 12,6-17,6 cm ve ağırlıkları 16,29-52,35 g arasında değişen 70 adet istavrit 10 grupta viral örneklendi.

2.1.1.11. İzmarit (*Spicara smarıs*, Linnaeus, 1758)

Akçaabat ve Çamburnu istasyonlarından 2009 (23 adet/5 grup), 2010 (227 adet/47 grup) ve 2011 (56 adet/17 grup) yılları Aralık-Mart ayları arasında boyları 10,7-22,0 cm ve ağırlıkları 11,25-118,55 g arasında değişen toplam 306 adet izmarit 69 grupta viral örneklendi.

2.1.1.12. Kayış Balığı (*Ophidion barbatum*, Linnaeus, 1758)

Akçaabat ve Çamburnu istasyonlarından 2009 (2 adet/1 grup), 2010 (6 adet/4 grup) ve 2011 (6 adet/3 grup) yılları Aralık-Mart ayları arasında boyları 11,0-21,5 cm ve ağırlıkları 6,35-57,43 g arasında değişen toplam 14 adet kayış balığı 8 grupta viral örneklendi.

2.1.1.13. Kurbağa Balığı (*Uranoscopus scaber*, Linnaeus, 1758)

Akçaabat, Çamburnu ve Çarşıbaşı istasyonlarından 2010 (62 adet/14 grup) ve 2011 (62 adet/19 grup) yılları Aralık-Mart ayları arasında boyları 8,2-23,5 cm ve ağırlıkları 9,00-243,40 g arasında değişen toplam 124 adet kurbağa balığı 33 grupta viral örneklendi.

2.1.1.14. Mezgıt (*Merlangius merlangus euxinus*, Linnaeus, 1758)

2009 yılı Ocak-Mart ayları arasında Akçaabat istasyonundan avlanan 368 adet mezgıt 64 grupta viral örneklendi. Çamburnu istasyonundan ise 2009 yılında 153 adet mezgıt 25 grupta, 2010 yılında 301 adet 60 grupta ve 2011 yılında 27 adet 5 grupta olmak üzere toplam 481 adet mezgıt 90 grupta viral örneklendi. Bu iki istasyondan toplam 849 adet mezgıt 154 grupta örneklendi.

Ayrıca, Yomra ve Çamburnu istasyonlarında 2009-2011 yılları Ocak-Mart ayları arasında olta ile avlanan 992 adet mezgıt bireysel (her grupta 1 adet balık) olarak örneklendi. Yomra istasyonundan, deniz kafeslerinde kültür balıkçılığı yapan bir işletmenin etrafından, 2009 yılında 211 adet ve 2010 yılında 442 adet mezgıt örneklenirken, Çamburnu istasyonundan 2011 yılında 339 adet mezgıt örneklendi. Bireysel olarak örneklenen mezgıtlar 2009 yılı örneklemelelerinde rastgele seçilirken 2010 ve 2011 yılı örneklemelelerinde 14 cm den daha küçük boydakiler tercih edildi. Bireysel olarak örneklenen mezgıt balıklarında yaş, Von-Bertalanffy denklemine göre balık boyundan yaş tahmini yapılarak hesaplandı.

2.1.1.15. Sardalya (*Sardina pilchardus*, Walbaum, 1792)

Çamburnu istasyonundan 2010 (9 adet/4 grup) ve 2011 (91 adet/24 grup) yılları Aralık-Mart ayları arasında boyları 14,3-18,4 cm ve ağırlıkları 19,06-43,08 g arasında değişen toplam 100 adet sardalya 28 grupta viral örneklendi.

2.1.1.16. Tirsi (*Alosa immaculata*, Bennett, 1835)

Akçaabat ve Çamburnu istasyonlarından 2009 (22 adet/8 grup), 2010 (42 adet/16 grup) ve 2011 (45 adet/18 grup) yılları Aralık-Mart ayları arasında boyları 14,7-34,7 cm ve ağırlıkları 20,98-330,87 g arasında değişen toplam 109 adet tirsi 42 grupta viral örneklendi.

2.1.1.17. Zargana (*Belone belone*, Linnaeus, 1758)

2010 yılı Aralık ayında Çamburnu istasyonundan avlanan, boyları 33,0-47,0 cm ve ağırlıkları 41,81-100,40 g arasında değişen toplam 49 adet zargana balığı 10 grupta viral örneklendi.

2.1.2. Prevalens Hesaplamaları

Hastalık tarama çalışmalarında prevalens (hastalığın görülme sıklığı, yayılım), örneklenen balıklardan, enfekte olanların örneklenen tüm balıklar içerisindeki oranını belirlemek amacıyla kullanılır. Bu çalışmada bireysel örneklenen balıklarda % prevalens;

(1) $P = (S / R) \times 100$ formülü kullanılarak hesaplandı (Last, 1988).

P=Prevalens

S=Enfekte balık sayısı

R=Örneklenen balık sayısı

Gruplar halinde örneklenen balıklarda ise, bir gruptaki her bir balık için virüs ile enfekte olabilme ihtimali Kline vd. (1989) metoduna göre aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı ve %2,5 ve %97,5 güven aralığında alt ve üst sınırlar belirlendi (Hauck, 1991).

(2) $P = [1 - (1 - S / R) \times 1 / C]$

P=Prevalens

S=Enfekte balık sayısı

R=Örneklenen balık sayısı

C=Her bir gruptaki balık sayısı

2.1.3. Balıkların Viral Örneklenmesi

İçerisinde buz bulunan strafor kutularda laboratuara ulaştırılan balıklar “Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü’nün (O.İ.E.)” tavsiye ettiği viral örnekleme yöntemine göre

örneklendi (O.İ.E., 2006). Bu yöntemle göre; her bir balığın boy (1 mm hassasiyette) ve ağırlık (0,01 g hassasiyette) değerleri kaydedildikten sonra dış yüzeyi %70'lik alkolle temizlendi. Vücut boşluğu açılarak karaciğer, böbrek ve dalaktan küçük organ parçaları alındı. 3-5 balığın organları 1 grup olacak şekilde, antibiyotiklerle (1000 IU/ml Penisilin, 500 µg/ml Gentamycin, 1000 µg/ml Streptomycin ve Amphotericine B) desteklenmiş Earl's Minimal Essential Medium (EMEM; Sigma co.) içeren plastik poşetlere konuldu. Homojenize edildikten sonra 2500 x g 4°C'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernetant yeni bir tüpe aktarıldı ve 100 kat seyreltildikten sonra 24 saatlik monolayer BF-2 (Bluegill Fry) ve EPC (Epithelioma Populosum Cyprini) hücre hatlarına inoküle edildi ve 15°C'de inkübasyona bırakıldı. Takip eden 14 gün boyunca ters ışık mikroskobu ile hücrelerde sitopatik etkilerin (CPE) oluşumu izlendi. CPE oluşan örnekler için oluşan CPE'nin toksisiteden kaynaklanıp kaynaklanmadığından emin olmak amacıyla viral inokülasyon işlemi tekrarlandı. Bu süreç sonucunda virüs içerdiği düşünülen örnekler -80°C'de muhafaza edildi.

2.2. Virüslerin Tanımlanması

Örneklenen balık türlerinden elde edilen VHSV izolatlarından RNeasy kiti (Qiagen) ile RNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra G genine (Glikoprotein) göre tersine transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) aşağıda açıklanacağı üzere gerçekleştirildi ve sekans analizleri ticari bir firma (Macrogen, Kore) tarafından yapıldı.

2.2.1. RNA Ekstraksiyonu

24 kuyucuklu test kaplarında VHSV ile enfekte olduğu belirlenen hücrelerden 100 µl alınarak 25 cm²'lik flasklarda 24 saatlik monolayer BF-2 hücrelerinin bulunduğu flasklara inoküle edildi ve bu flasktaki hücrelerden RNeasy mini kit (Qiagen) kullanılarak total RNA ekstraksiyonu yapıldı. Buna göre;

1. Hücrelerin hasatı için flasktaki besiyeri boşaltıldı ve flask PBS (phosphate buffered saline) ile yıkandı. % 0,1-0,25 i tripsin olacak şekilde yeniden PBS eklendi. Hücreler flaskın zemininden ayrıldıktan sonra serum içeren besiyerinden eklendi ve hücreler RNase-free tüplere aktarıldı. 300 x g 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernetant uzaklaştırıldı.

2. RLT Buffer eklendikten sonra tütün dip kısmına hafifçe vurularak pellet gevşetildi, vortexle karıştırılarak hücrelerin dağıtılması sağlandı.
3. RNase-free enjektör ile 5 kez ileri-geri çekilerek lizatin homojenizasyonu sağlandı.
4. Lizata 1 ölçek % 70'lik alkol eklendi ve pipetle karıştırıldı.
5. Numuneden 700 µl alındı ve 2 ml'lik RNeasy spin kolonuna transfer edildi. Kapağı yavaşça kapatıldı. $\geq 8000 \times g$ 15 saniye santrifüj edildi ve süpernetant uzaklaştırıldı.
6. RNeasy spin kolonuna 700 µl Buffer RW1 eklendi. Kapağı yavaşça kapatıldı ve $\geq 8000 \times g$ 15 saniye santrifüj edildi. Süpernetant uzaklaştırıldı.
7. RNeasy spin kolonuna 500 µl Buffer RPE eklendi. Kapağı yavaşça kapatıldı ve $\geq 8000 \times g$ 15 saniye santrifüj edildi. Süpernetant uzaklaştırıldı.
8. RNeasy spin kolonuna 500 µl Buffer RPE eklendi. Kapağı yavaşça kapatıldı ve $\geq 8000 \times g$ 2 dakika santrifüj edildi. Süpernetant uzaklaştırıldı.
9. RNA'nın ayrışması için, RNeasy spin kolonu yeni bir 1,5 ml lik toplama tüpüne yerleştirildi. 30–50 µl RNase-free su spin kolon membranına eklendi. Kapağı kapatıldı ve $\geq 8000 \times g$ 1 dakika santrifüj edildi.

2.2.2. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR amplifikasyonunda Nishizwa vd. (2002) tarafından dizayn edilen ve VHSV G geninin 587 bazlık (nt 175-761) korunmuş bölgesini hedefleyen ileri (forward primer); 5'-CCA GCT CAA CTC AGG TGT CC-3' ve geri (reverse primer); 5'-GTC ACY GTG CAT GCC ATT GT-3' primer setleri kullanıldı.

Viral cDNA, Tek Tüp (Titan One Tube) RT-PCR yöntemiyle çoğaltıldı. Bu uygulamada ticari bir firma (Roche, Almanya) tarafından üretilen kit üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda kullanıldı. Buna göre;

1. -20°C de saklanmış bileşenler çözündürüp vorteksledikten sonra santrifüj edildi. RNA miktarı spektrofotometre ile ölçülerek belirlendi ve her 50 µl reaksiyon için 110 ng RNA Template kullanıldı. Master Mix I olarak etiketlenirilmiş nuclease-free bir tüpe Template RNA konulduktan sonra 4 µl dNTP mix, 2,5 µl DTT solüsyonu, 50 pikomol Downstream Primer, 50 pikomol Upstream Primer, 1 µl RNase Inhibitör ilave edildikten sonra steril dH_2O ile 25 µl' ye tamamlandı. İyice karıştırıldıktan sonra tekrar santrifüj edildi ve kullanılıncaya kadar buz üzerinde bekletildi.

2. -20°C de saklanmış bileşenler çözündürüp vorteksledikten sonra santrifüj edildi. 14 µl steril dH₂O, 10 µl 5x RT PCR Buffer ve 1 µl enzim karışımı alınarak Master Mix II olarak etiketlenirilmiş nuclease-free bir tüpe konulduktan sonra iyice karıştırıldı ve tekrar santrifüj edildi ve kullanılmaya kadar buz üzerinde bekletildi.

3. Önceden hazırlanan 25 µl Master Mix I ve 25 µl Master Mix II, 200 µl lik ince çeperli bir PCR tüpüne konuldu. Bir süre buzda bekletildikten sonra karıştırıldı ve santrifüj edildi Termal dönüştürücüye (thermocycler) konulduktan sonra aşağıdaki döngüler tekrarlandı (Tablo 2).

Döngüler tamamlandıktan sonra elde edilen PCR ürünü etidyum bromür ile boyandı ve % 1,5 agaroz jel elektroforezde (110 V, 1 saat) koşturulduktan sonra ultraviyole ışık altında oluşan bantlar izlendi.

Tablo 2. Termal dönüştürücüde tekrarlanan döngüler (*: Uzama aşamasında süre her döngüde 5 saniye artırıldı)

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç	68°C	2 dk	
	50°C	30 dk	
Tersine Transkripsiyon (RT)	70°C	15 dk	
	68°C	7 dk	
Polimer Zincir Reaksiyonu (PCR)			
Denatürasyon (Başlangıç)	94°C	5 dk	
Denatürasyon (Ayrılma)	94°C	15 sn	
Bağlanma	52°C	30 sn	10 döngü
Uzama	68°C	2 dk	
Ayrılma	94°C	15 sn	
Bağlanma	52°C	45 sn*	25 döngü
Uzama	72°C	5 dk	

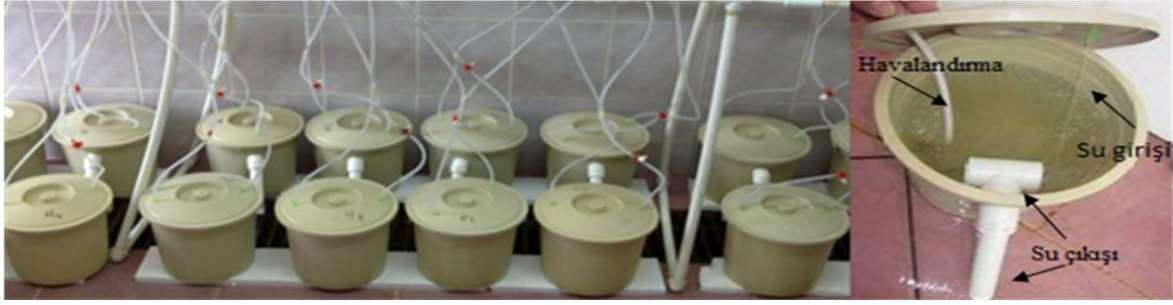
2.2.3. Sekans Analizleri

Sekans analizi ticari bir şirket olan Makrogen (Kore) tarafından yapıldı. Sekans verileri MEGA5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura vd., 2011) programı kullanılarak VHSV izolatlarının genotipleri belirlendi ve Doğu Karadeniz Bölgesi'nde kalkan balıklarından (TR-SW13G) ve Gürcistan'da gökkuşuğu alabalıklarından (GE-1.2) izole edilen suşlarla yakınlıkları belirlendi.

2.3. Deneysel Enfeksiyon Çalışmaları

2.3.1. Deney Düzenegi

Kaynak suyu veya deniz suyu ile beslenebilen, 3 litre su hacimli tankların kullanıldığı, sürekli hava destekli, su değişimi her bir tank için eşit, 10-15 tanktan oluşan bir deney düzenegi oluşturuldu (Şekil 2).



Şekil 2. Enfeksiyon çalışmalarının yapıldığı deney düzenegi

2.3.2. Deneysel Enfeksiyon Çalışmalarında Kullanılan Balıklar

2.3.2.1. Alabalıklar (*S. trutta labrax*, *S. fontinalis* ve *O. mykiss*)

Deneysel enfeksiyon çalışmalarında kullanılan alabalıklar Doğu Karadeniz Bölgesi'nde kurulu (Maçka/Trabzon), 2005 yılından itibaren viral hastalıklar açısından takip edilen ve VHSV taşımadıkları bilinen iki farklı işletmeden (Coşandere ve Altıntaş alabalık işletmeleri) temin edildi. Bu işletmelerden, henüz besin kesesini tüketmemiş ve yem almaya başlamamış Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax*, $0,14 \pm 0,03$ g), kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*, $0,1 \pm 0,02$ g) ve gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, $0,17 \pm 0,07$ g) larvaları alınarak Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Prof. Dr. İbrahim OKUMUŞ Yetiştiricilik ve Uygulama Ünitesinde bulunan Balık Hastalıkları Islak Laboratuvarında 60 litre su hacmine sahip ve kaynak suyu ile beslenen ($12^\circ\text{C} \pm 1$) tanklarda ayrı ayrı stoklandı. Stok tanklarında, adaptasyon ve yeme alışmaları için bir süre bekletildi. Daha sonra deney düzenegine (Şekil 3) aktarılarak VHSV'ne maruz bırakıldı.

2.3.2.2. Çipura (*Sparus aureta*) ve Levrek (*Dicentrarchus labrax*) Balıkları

Çalışmada kullanılan çipura ve levrek larvaları (yaklaşık 0,2 gram) Kılıç Holding'e ait Bafa/Muğla'da kurulu yavru üretimi ve adaptasyon ünitesinden temin edildi. Bu üniteden (24,5°C sıcaklıkta, %0,17 tuzlulukta) alınan larvalar 50 lt su hacmine sahip tanklarda havalandırma ile birlikte taşınarak Balık Hastalıkları Islak Laboratuvara ulaştırıldı. Bu laboratuvarında önceden hazırlanan ve 24°C sıcaklıkta çalışır durumda bulunan kapalı devre sistemine aktarıldı ve sitemdeki su sıcaklığı kademeli olarak azaltıldı. Deniz suyu sıcaklığı enfeksiyon için uygun değere (12°C) ulaştığında balıklar deney düzeneğine aktarıldı ve virüse maruz bırakıldı.

Levrek balıkları ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışmasında su sıcaklığının kısa sürede (7 gün) yükselmesi ve 16°C'nin üzerine çıkması nedeniyle bu çalışma tekrar edildi. Bu amaçla İDAGIDA'dan (Lapseki-ÇANAKKALE) tekrar levrek larvaları (yaklaşık 0,2 gram) alınarak yukarıda anlatıldığı gibi deney düzeneğine aktarıldı.

2.3.3. Deneysel Enfeksiyonlar İçin Virüs Hazırlanması

Deneysel enfeksiyon çalışmalarında, 2007 yılında mezgit balıklarından izole edilen MM1207 suşu (VSHV genotip-Ie) (Altuntaş ve Öğüt, 2010) kullanıldı. 5 adet 75 cm²'lik flaskta 24 saatlik monolayer EPC hücre hattı oluşturuldu ve MM1207 suşu ikinci pasajlamadan sonra bu flasklara inoküle edildi ve 15°C sıcaklıkta 5 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Beşinci günün sonunda flasklarda bulunan hücre kültürü sıvısı hücre kalıntılarından arındırılmak amacıyla 3000 x g - 4°C - 15 dakika santrifüj edildi ve steril tüplere aktararak VHSV stoğu oluşturuldu. Stoktaki virüs miktarı (TCID₅₀ ml⁻¹) titrasyon yöntemiyle (Dougherty, 1964) belirlendi.

2.3.4. Balıkların Virüse Maruz Bırakılması

2.3.4.1. Alabalıkların Virüse Maruz Bırakılması

Deneysel enfeksiyon çalışmalarında kullanılacak olan balıkların bulunduğu stok tanklarından rastgele bir şekilde alınan 20'şer adet balık gruplar halinde viral örneklenerek deney öncesinde balıkların virüs taşımadıkları teyit edildi. Stok tankından 700 adet balık

alınarak, 14 adet tanktan (3 tekerrürlü 4 grup ve 2 kontrol tankı) oluşan deney düzeneğindeki her bir tanka eşit sayıda (50 adet) konuldu ve adaptasyonları için bir hafta bekletildi. Balıklar virüse maruz bırakılacağı gün ve bir önceki gün aç bırakıldı.

Hazırlanan stok virüsün %85'i eşit miktarlarda 3 ayrı tüpe bölündü ve bu tüpler en yüksek doz olarak ilk gruba, stok virüsün geri kalanı ise her grup bir öncekinden 10 kat daha az olacak şekilde virüs süspansiyonları hazırlanarak diğer gruplara uygulandı. Kontrol tanklarına ise serum içermeyen minimal esansiyel medyum (MEM-0) uygulandı. Uygulama, tanklardaki su hacmi 1 litreye ayarlanması, hazırlanan virüs süspansiyonlarının pipetlenerek tanklara homojen bir şekilde dağıtılması ve takip eden 6 saat boyunca su giriş-çıkışının kapatılması şeklinde yapıldı.

Titrasyon yöntemiyle, stok virüsten balıklara uygulanan en yüksek dozlar Karadeniz alabalıklarında $10^{6,2}$ TCID₅₀ virüs ml⁻¹, gökkuşacağı alabalıklarında $10^{5,9}$ TCID₅₀ virüs ml⁻¹ ve kaynak alabalıklarında $10^{5,4}$ TCID₅₀ virüs ml⁻¹ olarak belirlendi.

Deney süresince sabah ve akşam olmak üzere günde iki kez balıklardaki anormallikler gözlemlendi. Tanklardaki ölü balıklar ve ölmek üzere olan balıklar alınarak tek tek plastik poşetlere konuldu ve etiketlendi. Balıklarda, önce görsel olarak hastalık belirtileri arandı ve eğer varsa hastalık belirtisi taşıyan balıklar mikroskop altında fotoğraflandı. Daha sonra viral örneklenerek hücre kültürüne inoküle edildi.

Türlere ve ölüm oranlarına bağlı olarak 14-21 gün sonunda deneysel enfeksiyon çalışmaları sonlandırıldı. Deney sonunda tanklarda hayatta kalan balıklardan ne kadarının enfekte olduğunun belirlenmesi amacıyla 20 şer adet balık 4 grupta viral örneklenildi.

2.3.4.2. Çipura ve Levrek Balıklarının Virüse Maruz Bırakılması

Deneysel enfeksiyon çalışmalarında kullanılacak olan çipura (ortalama $0,675 \pm 0,055$ g) ve levrek (ortalama $0,838 \pm 0,304$ g) balıklarının bulunduğu stok tanklarından rastgele bir şekilde alınan 16 adet balık 4 grupta viral örneklenerek deney öncesinde balıkların virüs taşımadıkları teyit edildi.

220 adet çipura alınarak, 11 adet tanktan (3 tekerrürlü 3 grup ve 2 kontrol tankı) oluşan deney düzeneğindeki her bir tanka eşit sayıda (20 adet) konuldu. Levrek balıklarıyla yapılan ilk deneysel enfeksiyon çalışmasında 290 adet balık alınarak, 10 tanktan (3 tekerrürlü 3 grup ve 1 kontrol tankı) oluşan deney düzeneğine her bir tankta eşit sayıda (30 adet) konuldu. Levrek balıklarıyla yapılan ikinci çalışmada ise 480 adet balık alınarak, 12

tanktan (3 tekerrürlü 3 grup ve 3 kontrol tankı) oluşan deney düzeneğine her bir tanka eşit sayıda (40 adet) aktarıldı.

Hazırlanan stok virüsün %'85'i eşit miktarlarda 3 ayrı tüpe bölündü ve bu tüpler en yüksek doz olarak ilk gruba, stok virüsün geri kalanı ise her grup bir öncekinden 100 kat daha az olacak şekilde virüs süspansiyonları hazırlanarak diğer tanklara uygulandı. Tanklardaki su hacmi 1 litreye ayarlandı ve hazırlanan virüs süspansiyonları pipetlenerek tanklara uygulandı. Takip eden 6 saat boyunca su giriş-çıkışı kapatıldı.

Deniz suyu sıcaklığının artmaya başlayarak 15°C'yi geçmesi sebebiyle çipura balıkları ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışması 16. günde sonlandırıldı. Deney sonunda tanklarda hayatta kalan balıklardan ne kadarının enfekte olduğunun belirlenmesi amacıyla en yüksek dozun uygulandığı tanklardaki tüm balıklar teker teker viral örneklendi, diğer tanklardaki balıklar ise gruplar halinde viral örneklendi.

Levrek balıkları ile ilk yapılan deneysel enfeksiyon çalışması deniz suyu sıcaklığı 15°C iken başladı ve 16°C'yi geçtiği 7. günde sonlandırıldı. Deney sonunda tanklardan 15'er adet balık alınarak teker teker örneklenerek VHSV ile enfekte olup olmadığı belirlendi. Levrek balıkları ile yapılan ikinci deneysel enfeksiyon çalışması ise 27. günde sonlandırıldı.

Deney süresince sabah ve akşam olmak üzere günde iki kez balıklardaki anormallikler gözlemlendi. Tanklardaki ölü balıklar ve ölmek üzere olan balıklar alınarak tek tek plastik poşetlere konuldu ve etiketlendi. Balıklarda, önce görsel olarak hastalık belirtileri arandı. Daha sonra viral örneklenerek hücre kültürüne inoküle edildi.

2.4. Farklı Hücre Hatlarının VHSV'ne Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Bu deney, VHSV'ne duyarlı olduğu bilinen ve araştırmalarda en çok kullanılan iki farklı hücre hattının (EPC ve BF-2) VHSV'ne karşı duyarlılıklarının karşılaştırılması amacıyla yapıldı. Ayrıca bu deneyde hücre hatlarının 7 günlük süreyle ürettikleri virüs miktarları da günlük olarak izlendi.

Bu amaçla; -80°C de stoklanan VHSV (MM1207) 25 cm² flasklarda hazırlanan BF-2 ve EPC hücre hatlarına inoküle edildi ve 15°C sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı (stok virüs). Stok virüsten her bir kuyucuk için 100 µl alınarak bir gün önceden hazırlanan 24 kuyucuklu test kaplarına (1 adet EPC ve 1 adet BF-2) inoküle edildi. Ayrıca stoktaki virüs

miktarını belirlemek amacıyla titrasyon testi yapıldı. Takip eden 7 gün boyunca 24 kuyucuklu test kaplarına ekilen virüslerden her gün 3 ayrı kuyucuktan (3 tekerrürlü) 100'er µl alındı ve 10^{-1} den 10^{-9} a kadar seyreltildikten sonra titrasyon testi yapılarak her gün için üretilen virüs miktarları belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. Saha Çalışmaları

Bu çalışmada, Akçaabat, Çamburnu, Çarşıbaşı, Hopa ve Yomra olmak üzere 5 farklı istasyondan canlı olarak avlanan 18 farklı türden toplam 5025 adet balık viral örneklendi. Örnekleme sonucunda tüm istasyonlardan VHSV taşıyan balıklar tespit edildi (Ek Tablo 3). Barbunya (*Mullus barbatus*) balıklarından 3 adet, dikenli vatoz (*Raja clavata*) balıklarından 2 adet, gelincik (*Gaidropsarus vulgaris*) balıklarından 5 adet, kum kayabalıklarından (*Neogobius melanostomus*) 2 adet, hamsi (*Engraulis encrasicolus*) balıklarından 3 adet, iskorpit (*Scorpaena porcus*) balıklarından 1 adet, istavrit (*Trachurus mediterraneus*) balıklarından 7 adet, kurbağa (*Uranoscopus scaber*) balıklarından 10 adet, mezgıt (*M. merlangus euxinus*) balıklarından 32 adet (10 adet grup halinde örneklenenlerden ve 22 adet bireysel olarak örneklenenlerden), sardalya (*Sardina pilchardus*) balıklarından 2 adet, tirsi (*Alosa immaculata*) balıklarından 2 adet ve zargana (*Belone belone*) balıklarından 1 adet olmak üzere toplam 70 adet VHSV-İle virüsü izolasyonu gerçekleştirildi. Ayrıca, Perşembe'de (Ordu) deniz kafeslerinde stoklanan istavrit balıklarından alınan 70 adet balığın 10 grupta viral muayenesi sonucunda 4 grupta VHSV tespit edildi.

Akçaabat istasyonundan 2009-2011 yılları arasında 15 farklı türden toplam 1399 adet balık 309 grupta viral örneklendi. Viral muayene sonucunda örneklenen türlerden barbunya (*Mullus barbatus*), dikenli vatoz (*Raja clavata*), gelincik (*Gaidropsarus vulgaris*), istavrit (*Trachurus mediterraneus*), mezgıt (*M. merlangus euxinus*) ve tirsi (*Alosa immaculata*) balıklarından VHSV izole edildi (Ek Tablo 3).

Çamburnu istasyonundan 2009-2011 yılları arasında 17 farklı balık türünden toplam 2142 adet balık 514 grupta viral örneklendi. Viral muayene sonucunda örneklenen türlerden barbunya (*Mullus barbatus*), gelincik (*Gaidropsarus vulgaris*), kum kayabalığı (*Neogobius melanostomus*), iskorpit (*Scorpaena porcus*), istavrit (*Trachurus mediterraneus*), kurbağa balığı (*Uranoscopus scaber*), mezgıt (*M. merlangus euxinus*), sardalya (*Sardina pilchardus*) ve zargana (*Belone belone*) balıklarından VHSV izole

edildi. Ayrıca 2011 yılında 339 adet mezigit bireysel olarak viral örneklendi ve bu balıkların 2 tanesinden VHSV izole edildi (Ek Tablo 3).

Çarşıbaşı istasyonundan 2009 yılı Nisan ayında 34 adet dikenli vatoz bireysel olarak, 2011 yılı Ocak ayında 70 adet hamsi 10 grupta ve 12 adet kurbağa balığı 3 grupta viral örneklenen balıklardan, viral muayene sonucunda dikenli vatoz (*Raja clavata*) balıklarının 1 tanesinden ve hamsilerden (*Engraulis encrasicolus*) 1 gruptan VHSV izole edildi (Ek Tablo 3).

Hopa istasyonundan 2010 yılında 100 adet çaça (*Sprattus sprattus phalericus*) 10 grupta, 75 adet istavrit (*Trachurus mediterraneus*) 15 grupta ve 200 adet hamsi (*Engraulis encrasicolus*) 20 grupta viral örneklendi. Viral muayene sonucunda sadece hamsilerden örneklenen 2 gruptan VHSV izole edildi (Ek Tablo 3).

Yomra istasyonundan 2009 yılında 211 adet ve 2010 yılında 442 adet mezigit (*M. merlangus euxinus*) bireysel olarak viral örneklendi. Viral muayene sonucunda 2009 yılında örneklenen 221 adet mezgitten 9 tanesinden ve 2010 yılında örneklenen 442 adet mezgitten 11 tanesinden VHS virüsü izole edildi (Ek Tablo 3).

Çalışmada örneklenen balıklardan VHSV ile enfekte olan balıkların prevalens değerleri Tablo 3'te gösterilmektedir.

Tablo 3. VHSV izole edilen balık türleri ve prevalens değerleri (P/G/n: Enfekte balık sayısı/örneklemedeki grup sayısı/örneklenen balık sayısı)

Tür	Tarih	P/G/n	Prevalens	Pmin	Pmax
AKÇAABAT					
Barbunya	23.03.2010	1/9/43	2,33	2,29	6,94
Gelincik	01.03.2010	2/5/23	9,72	0	23,19
İstavrit	07.02.2009	2/10/50	4,36	0	10,29
İstavrit	18.02.2011	1/18/90	1,14	0	3,52
Mezigit	19.03.2009	1/16/79	1,28	0	3,80
Tirsi	31.01.2010	1/3/15	7,79	0	22,55
Tirsi	11.02.2011	1/7/21	5,01	0	14,58
D. Vatoz	11.04.2009	1/8/8	12,5		
ÇARŞIBAŞI					
D.Vatoz	18.04.2009	1/34/34	2,94		
Hamsi	01.09.2011	1/10/70	1,49	0	4,40

Tablo 3'ün devamı...

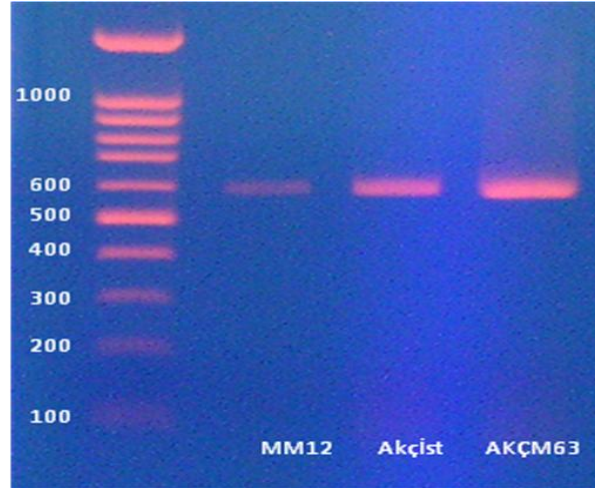
Tür	Tarih	P/G/n	Prevalens	Pmin	Pmax
ÇAMBURNU					
Barbunya	10.12.2010	1/13/65	1,58	0	4,68
Barbunya	02.03.2011	1/2/8	15,91	0	45,05
Gelincik	10/12/2010	1/1/3	100		
Gelincik	18.02.2011	1/2/2	50		
Gelincik	02.03.2011	1/2/2	50		
Kum Kayabalığı	04.01.2011	1/2/7	20,63	0	54,58
Kum Kayabalığı	19.01.2011	1/1/2	100		
İskorpit	30.01.2011	1/3/12	9,64	0	27,72
İstavrit	06.01.2010	2/5/30	9,71	0	21,51
İstavrit	09.01.2010	1/3/16	7,79	0	22,08
İstavrit	13.02.2010	1/10/10	10		
Mezgit	03.02.2010	2/16/81	2,64	0	6,22
Mezgit	30.03.2010	6/23/114	5,87	1,28	10,46
Mezgit	28.02.2011	1/4/20	5,59	0	16,27
Mezgit	27.01.2011	1/43/43	2,33		
Mezgit	28.03.2011	1/57/57	1,75		
Sardalya	02.03.2011	1/10/48	2,09	0	6,21
Sardalya	03.03.2011	1/4/20	5,59	0	16,27
Kurbağa Balığı	10.12.2010	5/9/46	14,97	2,69	27,26
Kurbağa Balığı	17.01.2011	1/1/6	100		
Kurbağa Balığı	19.01.2011	1/1/2	100		
Kurbağa Balığı	20.01.2011	2/2/8	100		
Kurbağa Balığı	23.01.2011	1/1/2	100		
Zargana	15.12.2010	1/10/49	2,09	0	6,17
HOPA					
Hamsi	20.02.2010	2/10/100	2,21	0	5,24
ORDU					
İstavrit	19.01.2009	4/10/70	7,04	0,32	13,76
YOMRA					
Mezgit	20.01.2009	4/43/43	9,30		
Mezgit	08.02.2009	4/80/80	5,00		
Mezgit	04.03.2009	1/88/88	1,14		
Mezgit	10.01.2010	2/82/82	2,44		
Mezgit	07.02.2010	6/62/62	9,68		
Mezgit	18.02.2010	2/73/73	2,74		
Mezgit	26.03.2010	1/23/23	4,35		

Ordu ili Perşembe ilçesi açıklarında gırgır avcılığı ile avlanan ve bir süre deniz kafeslerinde stoklanan istavrit balıklarında yoğun ölümlerin görülmesi üzerine bu balıklardan 70 adet alındı (boy:15,01±1,03 cm, ağırlık:33,78±7,39 g) ve 10 grupta viral muayene edildi. Muayene sonucunda ise 4 grupta VHSV tespit edildi.

3.2. Virüs İzolatlarının Tanımlanması

Hücre kültüründe sergilediği sitopatik etkilerine bakılarak VHSV ile enfekte olduğu düşünülen örnekler 25 cm²'lik flasklarda hazırlanmış monolayer BF-2 hücre hattına ekilerek çoğaltıldıktan sonra sırasıyla RNeasy Mini Kiti (Qiagen) ile viral RNA ekstraksiyonu yapıldı, glikoproteine (G geni) göre ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) işlemi gerçekleştirildi ve sekans analizlerinin yapılmasıyla virüsün tanımlanması işlemi tamamlandı.

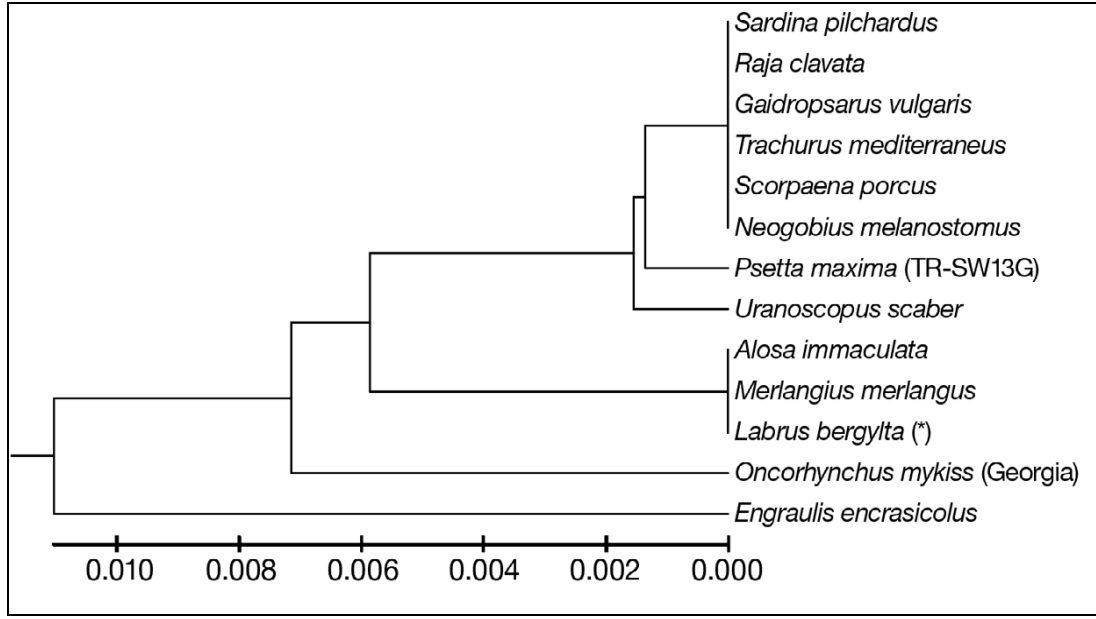
RT-PCR işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen PCR ürünleri %1,5 agaroz jel elektroforezde koşturuldu. Jelde oluşan bantların yaklaşık 600 bp seviyesinde ve daha önce VHSV-ile olduğu bilinen ve pozitif kontrol olarak kullanılan MM1207 ile aynı seviyede olduğu görüldü (Şekil 3).



Şekil 3. Agaroz jelde oluşan bantların görünümü

Bu çalışma kapsamında Doğu Karadeniz Bölgesi'nde doğal balık türlerinden izole edilen ve PCR işlemleri sonucunda VHSV oldukları belirlenen izolatların sekans analizleri

yapılarak genotipleri belirlendi ve daha önce yine Doğu Karadeniz Bölgesi'nde mezgit (*M. merlangus euxinus*, MM1207), kalkan (*Psetta maxima*, TR-SW13G) ve gökkuşuğu alabalıklarından (*O. mykiss*, GE-1.2) izole edilen ve genotip-Ie'ye dahil oldukları bilinen diğer izolatlarla karşılaştırıldı. Sekans analizleri sonucunda tüm izolatların genotip-Ie'ye dahil oldukları belirlendi. Bu izolatların birbirleri ve daha önceki izolatlara yakınlığı Şekil 4'te gösterilmektedir.



Şekil 4. VHSV (Ie) izolatlarının dendrogram ağacı. Dallar arasındaki mesafeler Maksimum Composite Likelihood Metod ile hesaplandı (Tamura vd., 2004).

3.3. Deneysel Enfeksiyon Çalışmaları

3.3.1. Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta labrax*)

Balık ölümlerinin fazla olması nedeniyle deneysel enfeksiyon çalışması 14. günde sonlandırıldı. Virüs kaynaklı balık ölümleri deneyin 5. gününde başladı ve deneyin son gününe kadar devam etti. En yoğun balık ölümleri en yüksek doz uygulanan grupta (H, $10^{6.2}$ TCID₅₀ virüs mL⁻¹) görüldü. Bu grupta virüs kaynaklı toplam ölü balık sayısı 29 adet olup ölüm oranının %8-34 (ortalama %19,33) olduğu belirlendi. Ölüm oranları diğer gruplarda ise uygulanan en yüksek dozdan en düşüğe doğru sırasıyla M grubunda %0-8 (ortalama %4), L grubunda %0-2 (ortalama 0,67) ve LL grubunda % 0-2 (ortalama 0,67)

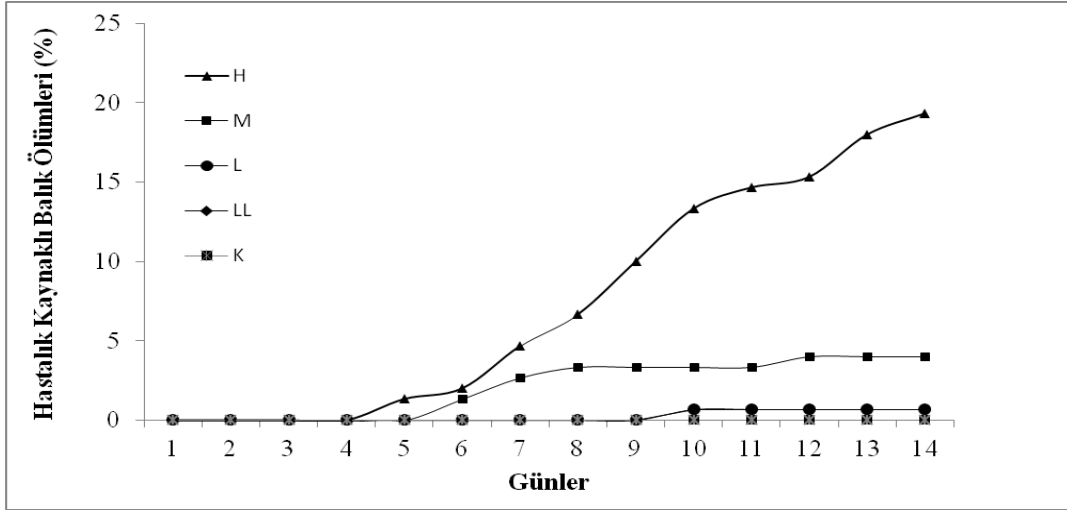
olarak görüldü (Tablo 4 ve Şekil 5). Yapılan istatistik testleri sonucunda gruplar arasındaki farklılığın önemli olduğu görüldü ($\chi^2=58.02$, $P<0.05$). L ve LL grupları arasında istatistiksel bir fark görülmezken ($P <0.05$), M grubu L ve LL grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel farkın önemli olduğu görüldü ($\chi^2 = 4,0$, $P < 0,05$).

Deney sonlandırılırken her bir tankta kalan canlı balıkların (SI) ne kadarının virüs taşıyıcısı olduğunu belirlemek amacıyla tanklardan rastgele bir şekilde 20'şer adet balık (5 balık x 4 grup) alındı ve gruplar halinde viral örneklendi. Örneklerin hücre kültürüne inokülasyonları sonucunda en yüksek dozun uygulandığı grupta (H) örneklenen 12 gruptan 3 tanesindeki balıkların ve en yüksek ikinci dozun uygulandığı grupta (M) örneklenen 12 gruptan 1 tanesindeki balıkların VHSV taşıdıkları belirlendi. Diğer gruplarda (L, LL ve K) ise virüs izolasyonu gerçekleşmedi (Tablo 4).

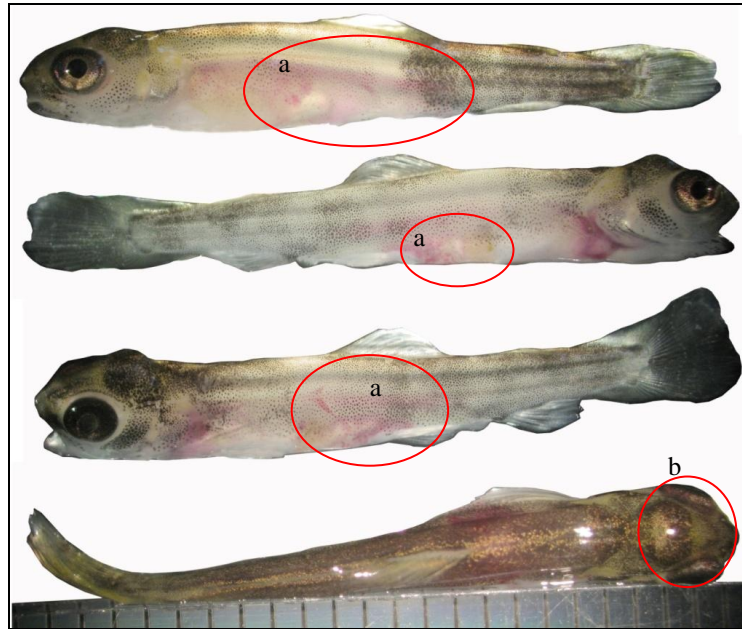
Tablo 4. Karadeniz alabalığı ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışması (AV: Balıklara uygulanan virüs miktarı ($TCID_{50} ml^{-1}$), NM: Doğal ölümler, DRM: Virüs kaynaklı ölümler, SI: Deney sonrasında hayatta kalan enfekte balıklar)

Grup	AV	n	NM	DRM	%DRM	SI
H	6.2	50	6	4	8	1/4
	6.2	50	4	8	16	0/4
	6.2	50	7	17	34	2/4
M	5.2	50	7	0	0	1/4
	5.2	50	9	4	8	0/4
	5.2	50	5	2	4	0/4
L	4.2	50	8	0	0	0/4
	4.2	50	2	0	0	0/4
	4.2	50	4	1	2	0/4
LL	3.2	50	7	0	0	0/4
	3.2	50	5	1	2	0/4
	3.2	50	6	0	0	0/4
K	K1	50	4	0	0	0/4
	K2	50	5	0	0	0/4

En yüksek doz uygulanan gruptaki tanklardan alınan ölü balıkların bir kısmında hemoraj, göz fırlaklığı, renkte koyulaşma, anüs çevresinde kızarıklık ve sadece 1 balıkta kafada balon oluşması şeklinde VHS'nin bazı belirtileri görüldü (Şekil 6).



Şekil 5. Karadeniz alabalıklarında virüs kaynaklı balık ölümleri (H: $10^{6,2}$, M: $10^{5,2}$, L: $10^{4,2}$, LL: $10^{3,2}$ ve K:0 TCID₅₀ virüs ml⁻¹)

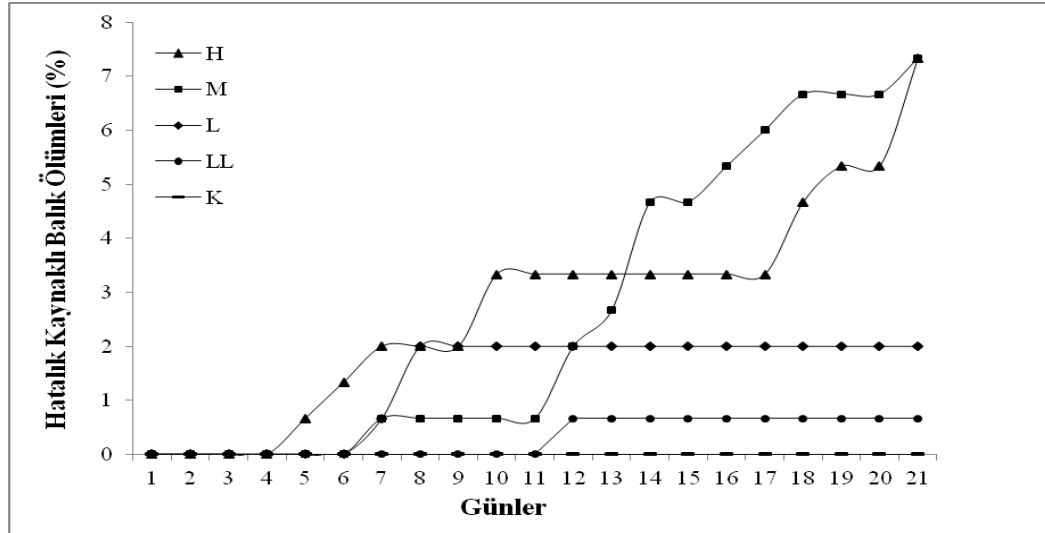


Şekil 6. Karadeniz alabalıklarında görülen VHSV klinik belirtileri (a: hemoraji, b) baş kısmında baloncuk oluşması)

3.3.2. Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)

Gökkuşığı alabalıkları ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışması 21. günde sonlandırıldı. Virüs kaynaklı balık ölümleri deneyin 5. gününde başladı ve deneyin son gününe kadar devam etti. En çok ölümler en yüksek doz (H, $10^{5,9}$ TCID₅₀ virus ml⁻¹) ve en yüksek ikinci dozun uygulandığı (M, $10^{4,9}$ TCID₅₀ virus mL⁻¹) gruplarda görüldü (Şekil 7). Bu gruplarda virüs kaynaklı toplam ölü balık sayısı 11'er adet olup ölüm oranının H grubunda %4-10 (ortalama 7,3) ve M grubunda %6-12 (7,3) olduğu belirlendi (Tablo 5). Yapılan istatistikî testler sonucu H ve M grupları arasındaki farkın önemsiz olduğu görüldü ($\chi^2=3,8$, $p>0,05$). En düşük iki doz grubundan L grubunda virüs kaynaklı balık ölümlerinin %2 olduğu görülürken LL grubunda %0,67 olduğu belirlendi.

Deney sonlandırılırken her bir tankta kalan canlı balıkların ne kadarının virüs taşıyıcısı olduğunu belirlemek amacıyla tanklardan rastgele bir şekilde 20'şer adet balık (5 balık x 4 grup) alındı ve gruplar halinde viral örneklendi. Örneklerin hücre kültürüne inokülasyonları sonucunda H grubundaki tanklardan örneklenen 12 gruptan 4 tanesinde, M ve L grubundaki tanklardan örneklenen grupların ise 3 tanesinde VHSV ile enfekte balıkların olduğu belirlendi (Tablo 5).

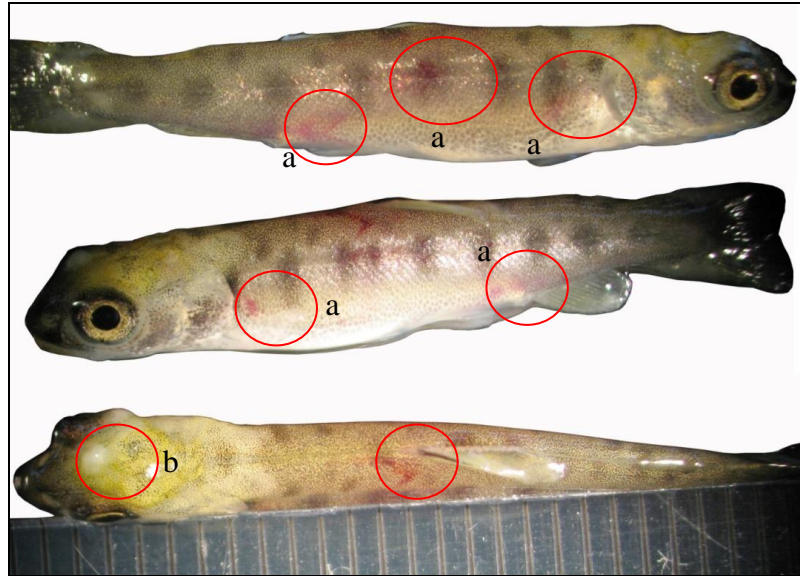


Şekil 7. Gökkuşığı Alabalıklarında virüs kaynaklı balık ölümleri (H: $10^{5,9}$, M: $10^{4,9}$, L: $10^{3,9}$, LL: $10^{2,9}$ ve K:0 TCID₅₀ virüs ml⁻¹).

Tablo 5. Gökkuşığı alabalığı ile yapılan deneysel enfeksiyon

Grup	AV	n	NM	DRM	%DRM	SI
H	5.9	50	1	4	8	0/4
	5.9	50	1	2	4	2/4
	5.9	50	3	5	10	2/4
M	4.9	50	1	3	6	2/4
	4.9	50	2	2	4	1/4
	4.9	50	2	6	12	0/4
L	3.9	50	2	1	2	1/4
	3.9	50	3	1	2	2/4
	3.9	50	3	1	2	0/4
LL	2.9	50	3	0	0	0/4
	2.9	50	1	0	0	0/4
	2.9	50	2	1	2	0/4
K	K1	50	1	0	0	0/4
	K2	50	1	0	0	0/4

Deney sırasında viral enfeksiyon sebebiyle ölen balıklarda Karadeniz alabalıklarında görülen klinik belirtilere benzer şekilde VHS'nin klinik belirtileri görüldü (Şekil 8).



Şekil 8. Gökkuşığı alabalıklarında görülen VHSV klinik belirtileri (a: vücudun çeşitli bölgelerinde hemoraji, b: baş kısmında baloncuk oluşması)

3.3.3. Kaynak Alabalığı (*Salvelinus fontinalis*)

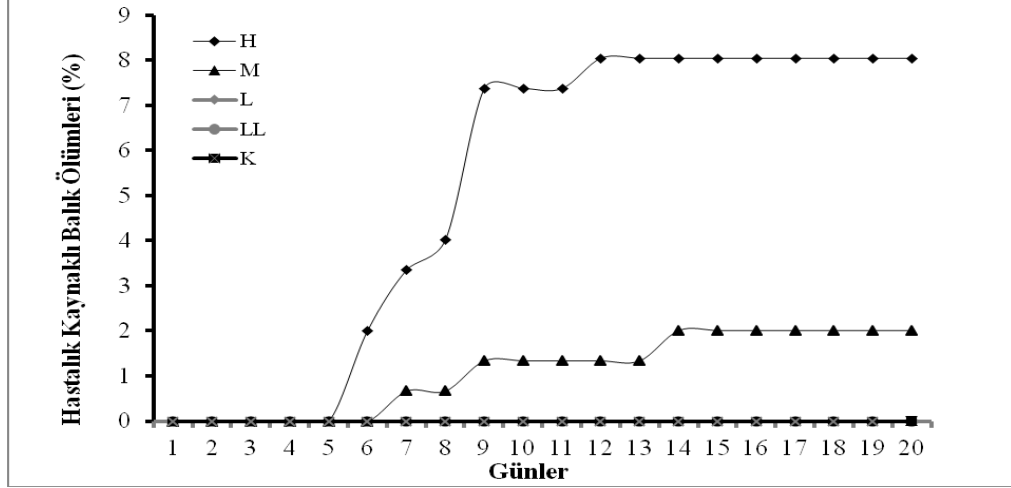
Kaynak alabalıkları ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışması 20. günde sonlandırıldı. Virüs kaynaklı balık ölümleri deneyin 6. gününde başladı ve 14. güne kadar devam etti. En fazla ölüm oranı %12 ile en yüksek doz uygulanan grupta (H, $10^{5.4}$ TCID₅₀ virüs·mL⁻¹) görüldü (Şekil 9). Bu grupta virüs kaynaklı toplam ölü balık sayısının 12 adet ve ölüm oranının %6-12 (ortalama %8) olduğu belirlendi. İkinci en yüksek doz uygulanan grupta ise (M, $10^{4.4}$ TCID₅₀ virüs·mL⁻¹) ölüm oranı % 0-4 (ortalama %1,3) iken diğer gruplarda virüs kaynaklı balık ölümleri görülmedi (Tablo 6). Yapılan istatistik testleri sonucunda H ve M gruplarındaki istatistiksel farkın önemli olduğu görüldü ($\chi^2=5,4$, $P<0,05$).

Tablo 6. Kaynak alabalığı ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışması

Grup	AV	n	NM	DRM	%DRM	SI
H	5.4	49	2	3	6	0/5
	5.4	50	2	6	12	0/5
	5.4	50	3	3	6	0/5
M	4.4	51	3	0	0	0/5
	4.4	49	1	0	0	0/5
	4.4	49	0	2	4	0/5
L	3.4	49	1	0	0	0/5
	3.4	50	1	0	0	0/5
	3.4	50	1	0	0	0/5
LL	2.4	50	0	0	0	0/5
	2.4	49	1	0	0	0/5
	2.4	49	0	0	0	0/5
K	K1	49	0	0	0	0/5
	K2	51	1	0	0	0/5

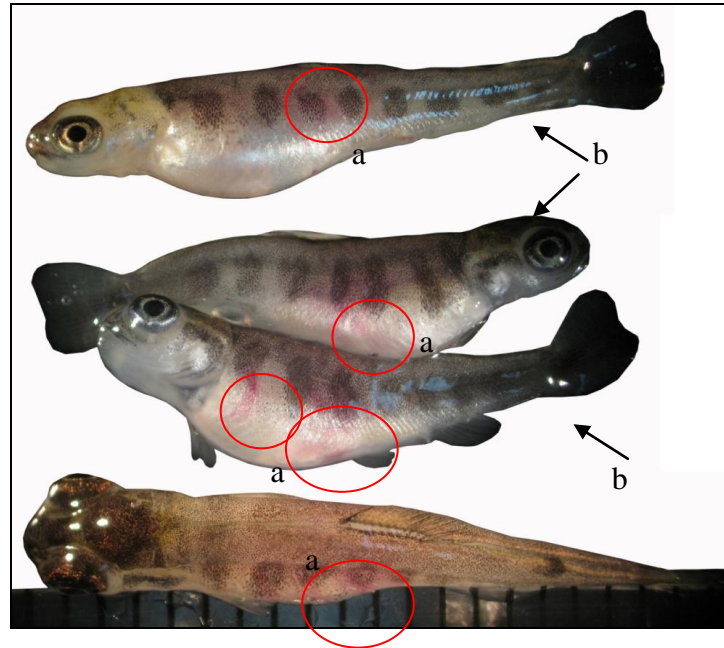
Deney sonlandırılırken her bir tankta kalan canlı balıkların ne kadarının virüs taşıyıcısı olduğunu belirlemek amacıyla tanklardan rastgele bir şekilde 20'şer adet balık (5

balık x 4 grup) alındı ve gruplar halinde viral örneklendi. Örneklerin hücre kültürüne inokülasyonları sonucunda hiçbir grupta virüs ile enfekte balıklara rastlanmadı (Tablo 6).



Şekil 9. Kaynak alabalıklarında virüs kaynaklı balık ölümleri (H:10^{5,4}, M:10^{4,4}, L:10^{3,4}, LL:10^{2,4} ve K:0 TCID₅₀ virüs ml⁻¹).

Deney sırasında viral enfeksiyon sebebiyle ölen balıklarda Karadeniz alabalıklarında ve gökkuşuğu alabalıklarında görülen klinik belirtilere benzer şekilde VHS'nin klinik belirtileri görüldü (Şekil 10).



Şekil 10. Kaynak alabalıklarında görülen VHSV klinik belirtileri (a: vücudun çeşitli bölgelerinde hemoraji, b) renkte koyulaşma)

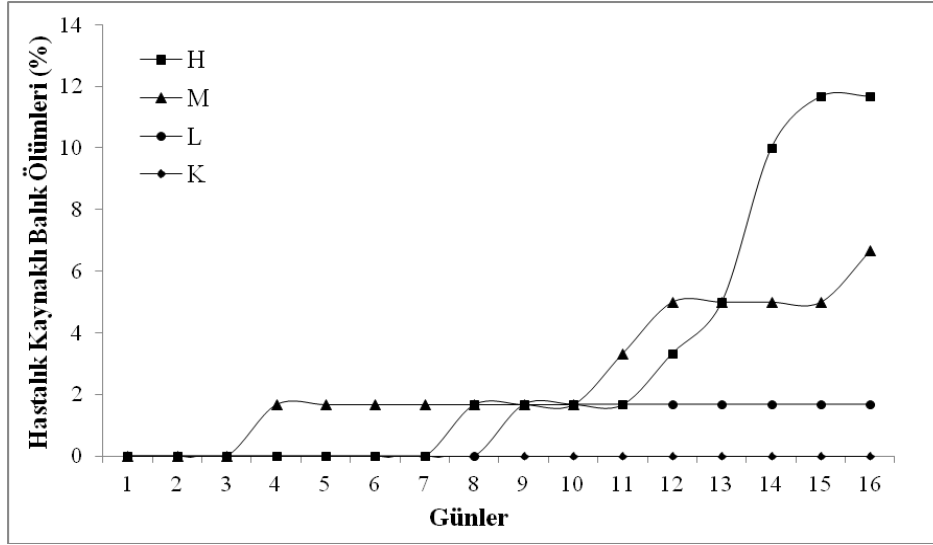
3.3.4. Çipura (*Sparus aureta*)

Çipura balıkları ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışması, deney başlangıcında 12°C olan deniz suyu sıcaklığının 15°C'yi geçmesi nedeniyle 16. günde sonlandırıldı. Virüs kaynaklı ilk balık ölümü deneyin 4. gününde görülmesine rağmen yoğun ölümler 11. günden sonra başladı ve deney sonuna kadar devam etti. Deney süresince gruplardaki virüs kaynaklı balık ölümlerinin en yüksek dozun (H, $10^{5.5}$ TCID₅₀ virüs ml⁻¹) uygulandığı grupta % 5-15 (ortalama % 11,7) ve en yüksek ikinci dozun (M, $10^{3.5}$ TCID₅₀ virüs ml⁻¹) uygulandığı grupta % 0-15 (ortalama % 6,7) ve en düşük dozun uygulandığı grupta (L, $10^{1.5}$ TCID₅₀ virüs ml⁻¹) ise % 0-5 olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise virüs kaynaklı balık ölümleri görülmedi (Tablo 7 ve Şekil 11).

Tanklardan alınan ölü balıklarda virüs kaynaklı herhangi bir hastalık belirtisine rastlanmadı. Deney sonlandırılırken hayatta kalan balıkların ne kadarının virüs taşıyıcısı olduğunu belirlemek amacıyla her bir tanktan 20 adet balık alındı ve bireysel olarak viral örneklendi. Örneklerin hücre kültürüne inokülasyonları sonucunda bu balıklarda virüse rastlanmadı (Tablo 7).

Tablo 7. Çipura balıkları ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışması (AV: Balıklara uygulanan virüs miktarı (TCID₅₀ ml⁻¹), NM: Doğal ölümler, DRM: Virüs kaynaklı ölümler, SI: Deney sonrasında hayatta kalan enfekte balıklar)

Grup	AV	n	NM	DRM	%DRM	SI
H	6,1	20	0	1	5	0/20
	6,1	20	0	3	15	0/20
	6,1	20	0	3	15	0/20
M	4,1	20	0	3	15	0/20
	4,1	20	0	1	5	0/20
	4,1	20	0	0	0	0/20
L	2,1	20	1	0	0	0/20
	2,1	20	0	1	5	0/20
	2,1	20	0	0	0	0/20
K	K1	19	0	0	0	0/20
	K2	19	2	0	0	0/20



Şekil 11. Çipura balıklarında virüs kaynaklı balık ölümleri (H:10^{6,1}, M:10^{4,1}, L:10^{2,1} ve K:0 TCID₅₀ virüs ml⁻¹).

3.3.5. Levrek (*Dicentrarchus labrax*)

Levrek balıkları ile yapılan ilk deneysel enfeksiyon çalışmasında deney başladıktan kısa bir süre sonra su sıcaklığının hızlı bir şekilde yükselmesi ve 15°C'nin üzerine çıkması sebebiyle deney 7. günde sonlandırıldı. Deney süresince virüs kaynaklı balık ölümleri görülmedi. Deney tanklarındaki balıklardan 15'er adet balık alınarak bireysel olarak viral örnekledi ve hücre kültürüne inoküle edildi. Örneklerin hücre kültürüne inokülasyonları sonucunda gruplarda VHSV'ne rastlanmadı (Tablo 8).

Tablo 8. Levrek balıkları ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışması (1. deney)

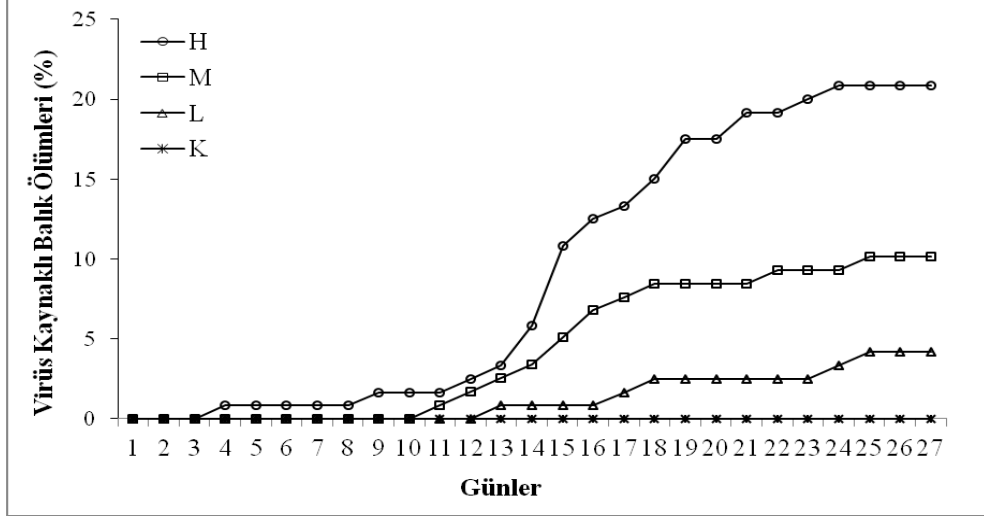
Grup	AV	n	NM	DRM	%DRM	SI
H	6,0	30	0	0	0	0/15
	6,0	30	1	0	0	0/15
	6,0	30	0	0	0	0/15
M	4,0	30	0	0	0	0/15
	4,0	30	0	0	0	0/15
	4,0	30	0	0	0	0/15
L	2,0	30	0	0	0	0/15
	2,0	30	1	0	0	0/15
	2,0	30	0	0	0	0/15
K	0	30	1	0	0	0/15

Levrek balıkları ile yapılan ikinci deneysel enfeksiyon çalışmasında ise virüs kaynaklı ilk balık ölümü deneyin 4. gününde görülmesine rağmen yoğun balık ölümleri 9-25. günler arasında görüldü. Deney süresince gruptaki virüs kaynaklı balık ölümlerinin en yüksek dozun (H, $10^{6,3}$ TCID₅₀ virüs ml⁻¹) uygulandığı grupta % 17,5-25 (ortalama % 20,8), en yüksek ikinci dozun (M, $10^{5,3}$ TCID₅₀ virüs ml⁻¹) uygulandığı grupta % 7,5-12,5 (ortalama %10) ve en düşük dozun uygulandığı grupta (L, $10^{4,3}$ TCID₅₀ virüs ml⁻¹) ise % 0-7,5 (ortalama 4,17) olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise virüs kaynaklı balık ölümlerinin olmadığı görüldü (Tablo 9 ve Şekil 12).

Deney sonlandırılırken her bir tankta kalan canlı balıkların ne kadarının virüs taşıyıcısı olduğunu belirlemek amacıyla tanklarda kalan balıklardan 15'er adet (M grubundaki bir tankta kalan 20 balığın tamamı alındı) alınarak bireysel olarak, kontrol grubunda kalan balıklardan ise 20'şer adet alınarak gruplar halinde (5 balık x 4 grup) viral örneklendi. Örneklerin hücre kültürüne inokülasyonları sonucunda H grubundan örneklenen 45 balığın 11 tanesinde, M grubundan örneklenen 50 balığın 8 tanesinde, L grubundan örneklenen 45 balığın 1 tanesinde VHSV tespit edilirken kontrol gruplarından alınan balıklarda virüse rastlanmadı (Tablo 9).

Tablo 9. Levrek balıkları ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışması (2. deney)

Grup	AV	n	NM	DRM	%DRM	SI
H	6,3	40	0	10	25	3/15
	6,3	40	0	8	20	5/15
	6,3	40	1	7	17,5	3/15
M	5,3	39	1	4	10	3/15
	5,3	40	1	3	7,5	2/15
	5,3	39	14	5	12,5	3/20
L	4,3	40	0	0	0	0/15
	4,3	40	0	3	7,5	1/15
	4,3	40	1	2	5	1/15
K1	0	40	0	0	0	0/4/20
K2	0	40	0	0	0	0/4/20
K3	0	40	0	0	0	0/4/20



Şekil 12. Levrek balıklarında virüs kaynaklı balık ölümleri (H:10^{6.1}, M:10^{4.1}, L:10^{2.1} ve K:0 TCID₅₀ virüs ml⁻¹).

3.4. Farklı Hücre Hatlarının VHSV'ne Duyarlılıklarının Belirlenmesi

İki farklı hücre hattının (EPC ve BF-2), Doğu Karadeniz'de mezgit balıklarından izole edilen VHSV'ne (MM1207, genotip-Ie) karşı duyarlılıklarının karşılaştırılması amacıyla yapılan bu çalışmada hücre hatlarının 7 günlük süreyle ürettikleri virüs miktarları günlük olarak izlendi.

-80°C'de stoklanan virüs 25 cm² flasklarda hazırlanan BF-2 ve EPC hücre hatlarına 100'er µl inoküle edildi ve 15°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılarak virüs stokları oluşturuldu. İnokülasyondan sonraki 4. günde EPC stok virüsü olan flasttaki tüm hücrelerin viral enfeksiyon sonucunda zeminden ayrıldığı görüldü. Aynı gün BF-2 stok virüsü olan flasttaki hücrelerin ise yaklaşık olarak yarısının zeminden ayrıldığı görüldü.

4. gün stok virüslerden 100'er µl alınarak bir önceki gün hazırlanan 96 kuyucuklu test kaplarında titrasyon testi yapıldı. Yapılan titrasyon testi sonucunda BF-2 virüs stoğunda 10^{7.25} TCID₅₀ ml⁻¹ virüs, EPC virüs stoğunda ise 10^{8.75} TCID₅₀ ml⁻¹ virüs olduğu belirlendi.

Yine 4. günde bir gün önceden hazırlanan 24 kuyucuklu test kaplarına virüs stoklarından 100'er µl inoküle edildi ve 7 gün boyunca günlük olarak titrasyon yapılarak üretilen virüs miktarları belirlendi (Tablo 10). BF-2 hücrelerinde ilk CPE oluşumu inokülasyondan sonraki 2. günde görüldü ve 7. günün sonunda ilgili kuyucuklardaki hücrelerin ancak % 85'inin zeminden ayrıldığı ve bu kuyucuktaki virüs miktarının 10^{7.48}

TCID₅₀ ml⁻¹ olduğu görüldü. EPC hücrelerinde ilk CPE oluşumu BF-2 hücrelerindeki benzer şekilde yine 2. günde görüldü. 4. günde CPE'nin %100 e ulaştığı ve bu günden sonraki günlerde kalan kuyucuklardaki virüs miktarının 10^{8,8}-10^{9,5} TCID₅₀ ml⁻¹ olduğu görüldü.

Tablo 10. Hücre kültürlerinde üretilen virüs miktarları

Zaman (saat)	BF-2		EPC	
	% CPE	Titer (TCID ₅₀ ml ⁻¹)	% CPE	Titer (TCID ₅₀ ml ⁻¹)
24	0	10 ^{5,98}	0	10 ^{8,62}
48	10	10 ^{7,21}	10	10 ^{8,36}
72	20	10 ^{7,47}	60-70	10 ^{8,70}
96	35-40	10 ^{7,39}	100	10 ^{8,88}
120	60-70	10 ^{7,13}	100	10 ^{9,5}
144	60-70	10 ^{7,13}	100	10 ^{9,06}
168	85	10 ^{7,48}	-	-

4.TARTIŞMA

4.1. VHSV'nün Doğal Balık Türlerinde Yayılımı ve Epidemiyolojisi

Bu çalışmada, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde seçilen 5 farklı istasyondan su sıcaklığının 15°C den daha düşük olduğu aylarda (Kasım-Nisan) avlanan 18 farklı balık türünde VHSV taraması yapıldı. Tarama sonucunda tüm istasyonlardan VHSV izolasyonları gerçekleştirildi. İstasyonlardan avlanarak viral muayene edilen balık türlerinden çaça (*Sprattus sprattus phalericus*), çinekop (*Pomatomus saltatrix*), dil balığı (*Solea sp.*), izmarit (*Spicara smaris*), kayış balığı (*Ophidion barbatum*) ve kömürcü kayası (*Gobius niger*) balıklarında VHSV'ne rastlanmazken, barbunya (*Mullus barbatus*), dikenli vatoz (*Raja clavata*), gelincik (*Gaidropsarus vulgaris*), kum kayabalığı (*Neogobius melanostomus*), hamsi (*Engraulis encrasicolus*), iskorpit (*Scorpaena porcus*), istavrit (*Trachurus mediterraneus*), kurbağa balığı (*Uranoscopus scaber*), mezgit (*M. merlangus euxinus*), sardalya (*Sardina pilchardus*), tirsi (*Alosa immaculata*) ve zargana (*Belone belone*) balıklarından birçok VHSV izolasyonu gerçekleştirildi (Ek tablo 3). Bu balıklardan barbunya, dikenli vatoz, gelincik, hamsi, istavrit, iskorpit, kurbağa balığı, tirsi ve zargana balıklarından VHSV ilk kez bu çalışma ile rapor edildi. Örnekleme yapılan tüm istasyonlardan ve örneklenen türlerin büyük çoğunluğundan VHSV izole edilmesi bu virüsün Doğu Karadeniz Bölgesi'nde endemik olduğunun bariz bir göstergesidir.

1979 yılında VHSV'nün doğal deniz balıklarından ilk izolasyonundan sonra gerek iç sulardaki, gerek denizlerdeki doğal balıklarda ve gerekse kültür balıkçılığında bu virüse karşı ilgi artmış ve birçok virüs tarama çalışması yapılmıştır. Başlangıçta sadece Avrupa'da var olduğu düşünülen VHSV'nün son yıllarda yapılan çalışmalar ile birlikte özellikle Asya, Avrupa ve Amerika'yı da içine alan kuzey yarım kürede geniş bir coğrafyada yayılım gösterdiği ve bu virüse karşı duyarlı türlerin sayısının her geçen gün arttığı görülmektedir. Dünya hayvan sağlığı örgütü (O.İ.E.) 2012 verilerine göre VHSV'ne karşı duyarlı balık türleri sayısının 82 olduğu ve deneysel ortamda 17 balık türünün de bu virüse karşı duyarlı olduğu bildirilmektedir (Ek tablo 1). Bu tez çalışması ile birlikte

VHSV'ne duyarlı balık türleri sayısı 82 den 91'e yükselirken, deneysel olarak enfekte olan balık türü sayısı ise 17 den 19'a yükseldi.

İzmarit ve kömürcü kayası balıklarından gerek bu çalışmada ve gerekse daha önce yapılan diğer çalışmalarda VHSV izolasyonu gerçekleşmedi. Işıdan ve Bolat (2011) tarafından yapılan çalışmada Doğu Karadeniz Bölgesi'nde bulunan 4 farklı istasyondan toplam 398 adet izmarit balığı viral örneklendi ve çalışma sonucunda virüs izolasyonu gerçekleşmedi. Brudeseth ve Evensen (2002) tarafından yapılan bir çalışmada Norveç'i çevreleyen kıyı sularından avlanan ve aralarında kömürcü kayası (140 adet) balıklarında bulunduğu *gobidae* familyası üyelerinden (two-spotted goby: *Gobiusculus flavescens*, sand goby: *Pomatoschistus minutus*, painted goby: *Pomatoschistus pictus*, transparent goby: *Aphya minuta*, crystal goby, *Crystallogobius linearis*) toplam 1300 adet kayabalığı örneklendi ve bu balıklardan VHSV izolasyonu gerçekleşmedi. Bu çalışmada da Akçaabat istasyonundan avlanan 23 adet kömürcü kayası balığı 10 grupta viral örneklendi ve bu balıklarda VHSV'ne rastlanmadı. Diğer taraftan Çamburnu istasyonundan avlanan 123 adet kum kayabalığı 28 grupta viral örneklendi ve 2 gruptan VHSV izolasyonu gerçekleşti.

Kayış (14 adet) ve çinekop (29 adet) balıklarında VHSV taraması ilk kez bu çalışmada yapıldı ve bu balıklardan virüs izolasyonu gerçekleşmedi. Dil balığı ise daha önce Brudeseth ve Evensen (2002) tarafından (2 adet) ve bu çalışmada (28 adet) örneklendi. Örneklenen balık sayısının az olması sebebiyle her üç balık türü için de VHSV için konak türler olup olmadığı konusunda kesin bir fikir belirtmek yanlış olacaktır.

Bazen doğal deniz balıklarından 1 tane VHSV ile enfekte balık bulabilmek için çok sayıda balık örnekleme gerekebilmektedir (Mortensen vd., 1999). Bu çalışmada VHS virüsü izolasyonu gerçekleşmeyen kayış balığı, çinekop balığı, dil balığı, kömürcü kayası balığı, çaça gibi balıklarda örnek sayısının artırılması ile VHS virüsü izolasyonlarının gerçekleşme ihtimali vardır. Nitekim bu balık türleri birçok yönden (beslenme, habitat, vb.) VHSV izole edilen balıklarla benzerlik göstermektedir.

Çaça balıkları genellikle Orta Karadeniz Bölgesi'nde orta su trolü avcılığı ile avlanmaktadır ve tamamı balık unu ve yağı fabrikalarında kullanılmaktadır. Diğer taraftan gırgır avcılığında hamsi ile birlikte avlanan az miktardaki çaça balıkları ise hamsi ile birlikte (çaça balıkları ayrılmadan aynı kasa içerisine konularak) kasalanarak insan tüketimine sunulmaktadır. Çalışmada kullanılan 252 adet çaça balığı (Çamburnu istasyonundan 152 adet ve Hopa istasyonundan 100 adet) gırgır teknesinde hamsilerin kasalanması esnasında seçilerek örneklendi ve bu balıklardan VHSV izolasyonu

gerçekleşmedi. Çalışmanın yapıldığı yıllarda (2009-2011) belirlenen istasyonlarda hamsi avcılığının kısa sürmesi ve hamsilerin arasında çaça balıklarının olmaması örnek sayısının az olmasına neden oldu.

Özellikle Atlantik Okyanusu, Kuzey Denizi, Baltık Denizi, Norveç kıyı suları, Kattegat ve Skagerrak bölgelerinde birçok araştırmacı tarafından çaça balıklarında VHSV taraması çalışmaları yapıldı. Mortensen vd. (1999) tarafından yapılan çalışmada Baltık Denizi'nden avlanan 350 adet çaça balığı 35 grupta viral örneklendi ve 8 gruptan VHSV izole edildi (prevalens: 2,56; Pmax: 4,32). Yine aynı çalışmada, daha sonraki örnekleme gezilerinde, Kuzey Denizi (173 balık 18 grupta) ve Kattegat ve Skagerrak Bölgesi'nden (405 balık 45 grupta) alınan örneklerde virüs izolasyonu gerçekleşmedi. Baltık Denizi'nde yapılan diğer bir çalışmada 2291 adet çaça 344 grupta örneklendi ve 36 gruptan VHSV izole edildi (prevalens:1,57; Pmax:2,00). Aynı çalışmada yapılan diğer örnekleme gezilerinde ise Kuzey Denizi (100 balık 20 grup), Kattegat (472 balık 48 grup) ve Skagerrak (175 balık 21 grup) kıyı sularından alınan toplam 747 adet çaça 89 grupta örneklendi fakat bu gruplarda VHS'ne rastlanmadı (Skall vd., 2005a). King vd. (2001b) tarafından yapılan çalışmada Kuzey denizi, Atlantik okyanusunun kuzey doğusu ve İrlanda kıyı sularından örneklenen 1704 adet çaça balığından ve Brudeseth ve Evensen (2002) tarafından yapılan çalışmada Norveç'in güney kıyı sularından örneklenen 440 adet balıktan VHSV izolasyonu gerçekleşmedi. Bu çalışmalarda görüldüğü üzere bir örnekleme çalışmasında aynı veya yakın bölgelerden bir çok VHSV izolasyonu yapılabilirken diğer örnekleme çalışmalarında hiç bir izolasyon yapılamayabilir. Çaça balıklarının Doğu Karadeniz'deki durumu hakkında daha kesin bir bilgi elde edebilmek için örnekleme çalışmalarının ve örneklenen balık sayısının artırılması gerekmektedir.

Kurbağa balıklarından VHSV taraması ilk kez bu çalışma ile yapıldı. Akçaabat (23 balık 5 grupta) ve Çamburnu (101 balık 28 grupta) istasyonlarından avlanan 124 adet balık 33 grupta viral örneklendi ve Çamburnu istasyonundan örneklenen balıklarda 10 gruptan VHSV izole edildi. Aralık 2010 tarihinde örneklenen balıklarda (46 balık 9 grupta örneklendi ve 5 gruptan virüs izole edildi) prevalens değerinin 14,97 (P_{\min} :2,69- P_{\max} :27,26) ve Ocak 2011 tarihinde örneklenen balıklarda (18 balık 5 grupta örneklendi ve tüm gruplardan virüs izole edildi) prevalens değerinin 100 olduğu görüldü. 2011 yılında Şubat-Nisan ayları arasında örneklenen balıklarda (25 balık 9 grupta) ise virüs izolasyonu gerçekleşmedi. Örneklenen balıkların önemli bir kısmında VHSV taşıyan balıkların

çokluğu ve prevalens değerlerinin diğer türlere göre yüksek olmasına rağmen bu balıklarda VHS'nin herhangi bir belirtisine rastlanmadı.

İskorpit balıklarından VHSV taraması ilk kez bu çalışma ile yapıldı. Akçaabat ve Çamburnu istasyonlarından avlanan 146 adet iskorpit 43 grupta örneklendi ve sadece 1 gruptan VHSV izole edildi (prevalens: 9,64, Pmax: 27,72).

Pasifik Sardalyası (*Sardinops sagax*) balıklarında yapılan VHSV taramalarında ve yoğun balık ölümleri ile görülen salgınlarda bazı araştırmacılar tarafından birçok VHSV izolasyonları yapıldı (Jones vd., 1997; Hedrick vd., 2003; Garver vd., 2013). Ülkemiz denizlerinde bulunan sardalya türü ise Avrupa Sardalyası'dır (*Sardine pilchardus*) ve Akdeniz, Marmara, Ege denizlerinde ve Karadeniz'in Marmara ile bağlandığı bölgelerde ekonomik olarak avlanan bir türdür (Whitehead, 1985; Reshetnikov, 2006). Son yıllarda Doğu Karadeniz Bölgesi'nde de av vermeye başlamıştır ve balıkçılık istatistiklerine (TÜİK, 2012) göre 967 tonu Doğu Karadeniz'den ve 525 tonu Batı Karadeniz'den olmak üzere toplam 1592 ton avlanmıştır. Bu çalışmada Çamburnu istasyonundan avlanan 100 adet sardalya 28 grupta örneklendi ve 2 gruptan VHSV izole edildi. Çalışmada örneklenen sardalya balıkları Aralık 2010-Mart 2011 tarihleri arasında Yeniay limanı içerisinde yaklaşık 12-15 metre derinlikten fanyalı dip ağları ile avlandı. Aralık-Şubat ayları arasında sardalya balıklarına nadiren rastlanırken (29 adet) Mart ayında ise balık sayısının arttığı (71 adet) ve ayrıca tüm balıklarda gonad oluşumunun tamamlandığı görüldü. Bu durum sardalya balıklarının bu istasyona üremek amacıyla geldiğine işaret etmektedir.

Tirsi balıkları *Clupeidae* familyasındandır ve sardalya, ringa, ve çaça balıkları ile yakın akrabadırlar. Dünya genelinde yapılan birçok çalışmada sardalya, ringa ve çaça balıklarından bir çok VHSV izolasyonu gerçekleştirildi (Dixon vd.,1997; 2003; Hershberger vd., 1999; Mortensen vd.,1999; King vd., 2001b, Hedrick vd.,2003). Tirsi balıklarından ise VHSV taraması ilk kez bu çalışma ile yapıldı. Akçaabat ve Çamburnu istasyonlarından toplam 109 adet tirsi balığı 42 grupta örneklendi ve 2 gruptan VHSV izole edildi.

Gelincik balıkları *Lotidae* familyasındandır ve özellikle büyük sayılarına göre isimlendirilirler. Ülkemiz denizlerinde *Gaidropsarus vulgaris* (Three-Bearded Rockling) yaygın olarak bulunurken yakın akrabaları olan *Gaidropsarus mediterraneus* (Shore Rockling), *Enchelyopus cimbrius* (sinonim: *Rhinonemus cimbrius*, Four-Beard Rockling)

ve *Ciliata mustela* (Five-Beard Rockling) ile sıkça karıştırılmaktadır. Bu çalışmada 3 bıyıklı gelincik balıkları (*G. vulgaris*) örneklendi.

Gelincik balıklarından (*Rhinonemus cimbrius*) VHSV ilk kez Mortensen vd. (1999) tarafından Baltık Denizi'nde yapılan bir çalışmada 11 adet gelincik balığının 7 grupta viral örnekleme ve 1 gruptan VHSV izole edilmesi ile rapor edildi (Prevalens $P=9,77$ - $P_{max}=27,5$). Sonraki çalışmalarda Kuzey Denizi, Kuzey Doğu Atlantik Okyanusu ve İrlanda kıyı sularında 121 adet (King vd., 2001b) ve Norveç kıyı sularından 25 adet (Brudeseth ve Evensen, 2002) örneklenen gelincik balığından (*R. cimbrius*) VHSV izolasyonları gerçekleşmedi.

Bu çalışmada, Akçaabat ve Çamburnu istasyonlarından toplam 67 adet (34 grup) gelincik balığı (*G. vulgaris*) viral örneklendi ve 5 gruptan VHSV izole edildi. 03 Ocak 2010 tarihinde Akçaabat istasyonundan avlanan 23 adet gelincik balığı 5 grupta viral örneklendi ve 2 gruptan VHSV izole edildi (Prevalens: 9,72, Pmax: 23,19). Bu balıkların tamamının cinsi olgunlukta olduğu ve üremek için sahile yakın bölgelere geldiği görüldü. Çamburnu istasyonundan 10 Aralık 2010 tarihinde tek bir grupta örneklenen 3 adet balıkta (Prevalens:100), 18 Şubat 2011 tarihinde bireysel olarak örneklenen 2 adet balıktan 1 tanesinde (Prevalens: 50) ve 02 Mart 2011 tarihinde yine bireysel olarak örneklenen 2 adet balıktan 1 tanesinden (Prevalens: 50) VHSV izole edilmesi özellikle üreme dönemlerinde gelincik balıklarının VHSV'ne yüksek duyarlılıkta olduğunu göstermektedir. Buna rağmen örneklenen hiçbir gelincik balığında VHS'nin klinik belirtilerine rastlanmadı.

Barbunya balıklarından VHSV taraması ilk kez Işidan ve Bolat (2011) tarafından Hopa-Ereğli arasındaki 8 farklı istasyondan toplam 492 adet barbunya balığının örnekleme ile yapıldı ve bu balıklardan VHSV izolasyonu gerçekleşmedi. Bu çalışmada ise Akçaabat ve Çamburnu istasyonlarından toplam 461 adet barbunya balığı 100 grupta viral örneklendi ve 3 gruptan VHSV izole edildi (prevalens; 1,58-15,91, Pmax; 4,68-45,05).

Hamsi balıklarından VHSV taraması ilk kez Işidan ve Bolat (2011) tarafından Hopa-Ereğli arasındaki 8 farklı istasyondan toplam 905 adet hamsinin örnekleme ile yapıldı ve bu balıklardan VHSV izolasyonu gerçekleşmedi. Bu çalışmada ise 20 Şubat 2010 tarihinde Hopa istasyonundan avlanan 100 adet hamsi 10 grupta örneklendi ve 2 gruptan (Prevalens: 2,21, Pmax: 5,24) ve 09 Ocak 2011 tarihinde Çarşıbaşı istasyonundan avlanan 70 adet hamsi 10 grupta örneklendi ve 1 gruptan (Prevalens: 1,49, Pmax: 4,40) VHSV izole edildi.

Dikenli vatoz balıklarından VHSV taraması ilk kez Işıdan ve Bolat (2011) tarafından yapıldı. Trabzon açıklarından avlanan 58 adet vatoz balığı viral örneklendi ve bu balıklardan VHSV izolasyonu gerçekleşmedi. Bu çalışmada ise Çamburnu istasyonundan örneklenen 28 adet dikenli vatoz balığında virüse rastlanmazken Akçaabat ve Çarşıbaşı istasyonlarından örneklenen toplam 42 adet dikenli vatozdan 2 tanesinden VHSV izole edildi.

Zargana balıklarından ilk kez VHSV taraması Mortensen vd. (1999) tarafından yapıldı ve 10 grupta örneklenen 30 adet zargana balığından virüs izolasyonu gerçekleşmedi. Bu çalışmada ise Çamburnu istasyonundan avlanan 49 adet zargana 10 grupta viral örneklendi ve 1 gruptan VHSV izole edildi (Prevalens: 2,09, Pmax: 6,17).

Mezgit balıklarından VHSV ilk kez Mortensen vd. (1999) tarafından Danimarka'yi çevreleyen sularda yapılan bir çalışma ile rapor edildi. Bu çalışmada 851 adet mezgit 93 grupta viral örneklendi ve sadece 2 gruptan VHSV izole edildi (Prevalens; 0,08, Pmax; 0,24). Daha sonra King vd. (2001b) tarafından yapılan çalışmada ise Kuzey Denizi, Atlantik Okyanusu'nun Kuzey-Doğusu ve İrlanda'yi çevreleyen sularda doğal deniz balıklarında VHSV taraması yapıldı. 3424 adet mezgit 350 grupta viral örneklendi ve sadece 1 gruptan VHSV izole edildi (Prevalens; 0,029, Pmax; 0,085) ve bu gruptaki balıkların ortalama boyları $11,3 \pm 1,1$ cm olarak ölçüldü. Diğer çalışmalarda ise Brudeseth ve Evensen (2002) tarafından Norveç güney kıyı sularından örneklenen 18 adet ve Dixon vd. (2003) tarafından İngiltere'yi çevreleyen kıyı sularından örneklenen 475 adet mezgitten virüs izolasyonu gerçekleşmedi. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada, Hopa-Ereğli arasındaki 9 farklı istasyondan alınan 714 adet mezgit balığı viral örneklendi fakat bu balıklardan VHSV tespit edilemedi (Işıdan ve Bolat, 2011). Doğu Karadeniz Bölgesi'nde, Yomra Koyu'nda (Trabzon), yapılan diğer bir çalışmada ise 2007-2008 yıllarında mezgit balıkları aylık örneklenerken VHSV taraması yapıldı ve Şubat, Mart ve Nisan aylarında bu balıklardan VHSV izole edildi (prevalens: 1,35-3,14) (Altuntaş, 2007; Altuntaş ve Öğüt, 2010). Bu çalışmada ise prevalens değerlerinin gruplar halinde örneklenen balıklarda Akçaabat istasyonunda 1,28 (Pmax 380), Çamburnu istasyonunda 2,64-5,87 (Pmax 6,22-16,27) olduğu, bireysel olarak örneklenen balıklarda ise Çamburnu istasyonunda 1,75-2,33, Yomra istasyonunda ise 1,14-9,68 arasında değiştiği görüldü.

Bu çalışmada mezgit balıklarında görülen prevalens değerlerinin diğer çalışmalara göre daha yüksek olmasının sebebi örnekleme stratejisi ile ilgilidir. 2009 yılında bireysel

olarak örneklenen mezgitlerde her hangi bir kriter aranmazken sonraki yıllarda örneklemelelerde sadece 14 cm den küçük bireyler örneklendi. 2009 yılında Yomra istasyonundan Ocak (43 adet), Şubat (80 adet) ve Mart (88 adet) aylarında boyları 11,6-23,0 cm ve yaşları 0,95-4,51 arasında değişen toplam 211 adet mezgıt örneklendi ve 9 adet mezgitten VHSV izole edildi. Bu mezgitlerden 1 yaşından küçük 2 balıktan 1 tanesinin (%50), 1-2 yaş aralığındaki 101 adet mezgitten 6 tanesinin (%5,94) ve 2 yaşından büyük 108 adet mezgitten 2 tanesinin (% 1,85) VHSV ile enfekte olduğu görüldü. Ayrıca bu 9 balıktan 2 tanesinin erkek 7 tanesinin ise dişi olduğu görüldü.

2010 yılında yine Yomra istasyonundan boyları 8,7-17,8 cm ve yaşları 0,36-2,74 arasında değişen 442 adet mezgıt örneklendi. Bu balıklardan 1 yaşından küçük 62 adet ve 2 yaşından büyük 16 adet mezgitte VHSV'ne rastlanmazken 1-2 yaş aralığındaki 364 adet mezgitten 11 tanesinden virüs izole edildi ve enfekte balıkların 5 tanesinin erkek 6 tanesinin ise dişi olduğu görüldü.

2011 yılında ise çalışma (bireysel mezgıt örnekleme) Çamburnu istasyonunda yapıldı. Boyları 9,5-14,1 cm ve yaşları 0,32-1,64 arasında değişen (1 yaşından küçük 76 adet, 1-2 yaş aralığında 263 adet) 339 adet mezgıt örneklendi ve sadece 2 tanesinden VHSV izole edildi. Enfekte balıkların 1,12 (Dişi) ve 1,49 (Erkek) yaşlarında olduğu görüldü.

İstavrit balıklarından, Kuzey Denizi, Kattegat ve Skagerrak bölgelerinden (Mortensen vd., 1999), İskoçya'nın kuzey ve batı kıyı sularından (King vd., 2001b), Norveç kıyı sularından (Brudeseth ve Evensen, 2002), İngiltere'yi çevreleyen kıyı sularından (Dixon vd., 2003) ve Pazar (Rize)-Ereğli arasındaki 8 farklı istasyondan (Işıdan ve Bolat, 2011) VHSV tarama çalışmaları yapıldı ve bu çalışmalarda virüs izolasyonu gerçekleştirilmedi. Bu çalışmada ise Akçaabat istasyonundan 3 adet (Prevalens:1,49, pmax:4,40) ve Çamburnu istasyonundan 4 adet (Prevalens:1,49, pmax:4,40) VHSV izolasyonu gerçekleştirildi. Ayrıca Ordu ili Perşembe ilçesi açıklarında deniz kafeslerinde stoklanan istavritlerde yoğun balık ölümleri görülmesi üzerine yapılan viral muayenede 70 balık 10 grupta örneklendi ve 4 gruptan VHSV izole edildi.

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde Hopa-Ereğli arasında yapılan bir çalışmada 12 farklı balık türünde (Tablo 1) VHSV taraması yapıldı ve sadece kalkan balıklarından bu virüs izole edildi ve çalışma sonucunda diğer 11 türün VHSV'den arî olduğu rapor edildi (Işıdan, 2010; Işıdan ve Bolat, 2011). Bu 12 balık türünden 6 tanesi (hamsi, izmarit, istavrit, barbunya, mezgıt, ve dikenli vatoz) bu çalışmada da viral örneklendi ve bunlardan

izmarit dışında tüm diğer türlerden VHSV izolasyonları gerçekleşti. Bu bağlamda bu iki çalışmanın sonuçları farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıkların sebeplerinin örnekleme stratejisi ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma 2009-2011 yılları arasında deniz suyu sıcaklığının 15°C' den daha düşük olduğu dönemlerde (Aralık ayı başı-Nisan ayı sonu boyunca) yapıldı, diğer çalışma ise sadece sonbahar ve ilkbahar aylarında yapıldı. Bölgede yapılan diğer bir çalışmada (Altuntaş ve Öğüt, 2010) mezzit balıkları aylık olarak örneklendi ve Ocak-Nisan ayları arasında (özellikle Ocak ve Şubat aylarında) mezzit balıklarında birçok VHSV-İe izolasyonları gerçekleştirildi. Benzer şekilde bu çalışmada da birçok balık türünde sadece ilkbahar aylarında (17 izolat/579 grup) değil kış aylarında da (57 izolat/1352 grup) VHSV-İe izolasyonları gerçekleşti (Ek Tablo 3). Dolayısıyla kış aylarının Doğu Karadeniz Bölgesi'nde VHSV taraması için mutlaka örneklenmesi gereken bir dönem olduğu görülmektedir.

Diğer bir husus ise örneklerin seçimi, muhafazası ve virüsün teşhisi ile ilgilidir. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OİE) ve Avrupa Topluluğu (2001/183/EC) VHSV'nün teşhis ve teyidi için örnekleme planları ve teşhis yöntemleri hakkında direktifler yayımlamıştır (OİE, 2006; EC, 2001). Buna göre, örnekler yalıtılmış bir kutu (saklama kabı, strafor gibi) içerisinde ve soğuk muhafaza edilerek en kısa zamanda laboratuara ulaştırılmalı, taşıma sırasında örneklerin donmamasına, ısınmamasına (10°C'den daha soğuk olmalı) ve güneş ışığından korunmasına dikkat edilmeli ve örnekleme yapıldıktan sonra en geç 48 saat içerisinde örnekler hücre kültürüne inoküle edilmeli şeklinde tavsiyeler sunulmaktadır. Bu çalışmada viral örnekleme Çarşıbaşı ve Hopa istasyonlarından gırgır avcılığı yapan teknelerden alınan balıklar ve Akçaabat istasyonundan balıkçı teknelerinden alınan balıklardan ölmek üzere olan ve/veya henüz yeni ölmüş balıklar seçildi ve bu balıklar soğuk muhafaza ile (strafor kutu + buz) kısa bir süre içerisinde laboratuara ulaştırıldı, aynı gün viral muayene edildi ve en geç 24 saat içerisinde hücre kültürüne inoküle edildi. Çalışmada kullanılan diğer balıklar ise canlı olarak avlandı ve yine aynı şekilde soğuk muhafaza edilerek çok kısa bir süre içerisinde laboratuara ulaştırıldı. Diğer çalışmada (Işıdan, 2010; Işıdan ve Bolat, 2011) ise balıklar istasyonlardaki balıkçı teknelerinden alınarak araçtaki seyyar buzdolabında saklandı ve viral muayeneye kadar -80°C de stoklandı. Balıkların dondurulması-çözündürülmesi işlemi sırasında virüsün inaktif hale geldiği bazı araştırmacılar tarafından söylenmektedir. Bu çalışmalarda, bir kez -80°C de dondurulup çözündürülen örneklerde virüs infektivitesinin

1000 kata kadar azaldığı ve böyle bir dondurma-çözündürme işlemi sonrasında ancak dokularında yüksek miktarda virüs bulunan balıklardan virüs izolasyonu gerçekleştirilebileceği vurgulanmaktadır (Mortensen vd.,1999; Meyers vd., 1994; 1999).

VHS hastalığında, hastalığın şiddetine göre akut, kronik ve latent (taşıyıcı) olmak üzere 3 durumdan herhangi birisi görülebilir ve her bir hastalık tipinde farklı klinik belirtiler görülebilir (Yasutake, 1970; Wolf, 1988). Akut tipte, tipik olarak ani ve yoğun ölümler görülür. Balıklarda uyuşukluk, renkte koyulaşma, ekzoftalmus ve kansızlık görülebilir. Gözlerde, deride, solungaçlarda ve yüzgeç kaidelerinde kanamalar görülebilir. Göz çevresinde, iskelet kaslarında ve iç organlarda nokta şeklinde kanamalar görülebilir. Karaciğerde yer yer renk farklılaşmaları ile birlikte şişkinlik ve kan toplanması vardır. Böbrekler kırmızı renkte ve incelmıştır. Kronik olarak enfekte olmuş balıklarda önemli derecede yoğun ölümler görülür fakat ölümler akut tipe göre daha uzun zamana yayılmıştır. Balıklarda uyuşukluk, renkte koyulaşma, ekzoftalmus ve şiddetli kansızlık görülebilir. Hemoraj (kanama) da görülebilir fakat şiddetli değildir. Karaciğer, dalak ve böbreğin ödemine bağlı olarak karın şişkindir. Karaciğer soluktur ve petek şeklinde kızarıklıklar vardır. Latent enfeksiyonda ölüm oranı düşüktür ve balık normal görünümündedir fakat hiperaktif olabilir (McAllister, 1990).

Bu çalışmada 18 farklı türden toplam 5025 adet balık örneklendi ve 74 adet virüs izolasyonu gerçekleştirildi. Örnekleme sırasında tüm balıklar gözle muayene edilerek deride, gözlerde ve çevresinde, iç organlarda VHS'nin tipik bir belirtisi olan hemoraj (kanama) arandı. Fakat hiçbir balıkta hastalık belirtisine rastlanmadı. VHSV izole edildiği halde hiçbir klinik belirti görülmeyen çalışmalar sıklıkla görülmektedir (Mortensen vd., 1999; Brudeseth vd., 2002; Smail, 1995; 2000). King vd. (2001b) tarafından, bu balıklarda düşük konsantrasyonlarda virüs bulunabileceği ve bu tür balıkların "asemptomatik taşıyıcılar" olarak isimlendirilebilecekleri söylenmektedir.

Su sıcaklığı, balık türü, yaş (hayat evresi), stres, stok yoğunluğu, virüs straini gibi faktörler hem doğal balıklardan virüs tarama çalışmalarında hem de deneysel enfeksiyon çalışmalarında VHS'nin epidemiyolojisini ve patojeniteyi etkileyen önemli faktörlerdir.

4.1.1.Su Sıcaklığı

VHS salgınlarında su sıcaklığı önemli bir çevresel faktördür. Hastalık daha çok 4-14°C su sıcaklıklarında görülür. 15°C'nin üzerindeki sıcaklıkların virüsün çoğalması

üzerine olumsuz etkileri olduğu bildirilmektedir. Su sıcaklığına bağlı olarak 7–15 günlük bir inkübasyon süresi vardır. Replikasyon için optimum su sıcaklığı 9-12°C ve optimum pH 7,4–7,8 dir. Replikasyon 6°C de çok azdır ve 20°C de hiç yoktur (de Kinkelin vd., 1980; Bernard vd., 1983; McAllister, 1990). VHS yılın her mevsiminde gözlenmekle beraber salgınlar genellikle su sıcaklıklarında dalgalanmaların olduğu dönemlerde daha çok görülür (Acosta vd.,2005). Bu çalışmanın yapıldığı aylarda (Aralık-Nisan) deniz suyu sıcaklarının yüzey suyunda (0 m) 8-17°C, 25 m derinlikte 8,6-14,5°C ve 50 m derinlikte 8,3-14°C aralığında olduğu ve bu sıcaklık aralığının VHSV enfeksiyonları için optimum değerlerde olduğu görüldü.

4.1.2. Hayat Evresi

VHSV'ne duyarlılık her balık türünde aynı değildir. Enfeksiyon her yaş grubunda görülebilir fakat genç balıklar yetişkin balıklara göre enfeksiyona daha duyarlıdır. Enfeksiyonda hayatta kalan balıklar hayatları boyunca virüs taşıyıcısı olurlar ve virüsü idrar ve üreme sıvısıyla çevreye saçarlar (McAllister, 1990).

Mezgit balıklarında yaş değeri Von-Bertalanffy büyüme eşitliği kullanılarak belirlendi. Bu eşitliğe göre mezgit balıklarında dişiler yaklaşık 15,4 cm boyunda, erkekler ise yaklaşık 14,7 cm boyunda 2 yaşına ulaşmaktadır. Bu çalışmada, bireysel olarak örneklenen mezgit balıklarında 2010 ve 2011 yıllarında yapılan örneklemelemlerde özellikle 14 cm den (2 yaşından küçük) küçük bireyler tercih edildi. 2009 yılında örneklenen ve 1-2 yaş aralığında olan 101 adet mezgitten 6 tanesinin, 2 yaşından büyük 108 adet mezgitten 2 tanesinin, 2010 yılında örneklenen 1 yaşından küçük (62 adet) ve 2 yaşından büyük (16 adet) bireylerde virüse rastlanmazken yine 1-2 yaş aralığındaki bireylerden (364 adet) 11 tanesinin VHSV ile enfekte olması mezgit balıkları için 1-2 yaş aralığının bu virüse karşı en duyarlı olduğu dönem olarak gözükmektedir.

4.1.3. Stres

Balıklarda stres konusu birçok araştırmacı tarafından araştırılmış ve birçok farklı stres tanımı yapılmıştır (Selye 1950; 1973; Mazeaud vd., 1977; Wendelaar-Bonga, 1997; Francis-Floyd, 1990b; Pickering 1981; Schreck, 2000; Elmen vd., 1998; Barton ve Iwama, 1991). Stres, organ fonksiyonlarının optimum dengeden uzaklaşması durumudur ve buna

yol açan her türlü madde, işlem veya uygulama stresör (stres faktörü) olarak tanımlanmaktadır (Francis-Floyd, 1990b). Bununla birlikte stres hayvanın optimum koşullar dışında verdiği adaptif fizyolojik yanıtlar toplamı olarak da tanımlanabilmektedir (Wendelaar-Bonga, 1997). Stres, akut veya kronik olabilmektedir. Her iki stres tipinde de balık bu stres durumunun üstesinden gelebilmek için ekstra enerjiye ihtiyaç duyar. Solunum oranı artar, kan basıncı düşer ve genellikle kırmızı kan hücresi miktarı artar. Balıklar normalde stresin oluşturduğu bu ilkin etkilere dayanabilir. Ancak strese maruz kalma süresi ve/veya balıkların ikinci bir stresöre daha maruz kalması balıkların enerji rezervlerinin tükenmesine yol açabilir (Reid vd., 1998). Bu durum balıkların fırsatçı patojenlere karşı savunmasız hale gelmesine yol açabileceği gibi direkt ölüme de yol açabilir (Sommerset vd., 2005).

Diğer viral hastalıklarda olduğu gibi VHS hastalığında da stres patojenite ve epidemileri etkileyen önemli bir faktördür. Enfeksiyonu atlatan balıklarda virüs gizli kalabilir ve ileride gerçekleşebilecek bir stres faktörüyle beraber tekrar virüs saçılımı söz konusu olabilir (Acosta vd., 2005; de las Heras vd., 2008; Knuessel vd., 2003; Skall vd., 2004b; Snow vd., 2005). Özellikle yüksek stok yoğunluğu, kötü beslenme, yetiştiricilik faaliyetleri, balık transferi vs. gibi durumlara maruz kalan balıklarda artan strese bağlı olarak VHSV'nün yoğunluğu ve hastalığın derecesi artabilir ve bunun sonucunda da önemli miktarda balık ölümleri meydana gelebilir (Jørgensen, 1974; Hershberger vd., 1999).

Balıklar dinamik bir ortamda yaşadıklarından, oluşabilecek ani çevresel değişimlerin yol açacağı strese hızlı ve etkili bir şekilde adapte olabilmeye kabiliyetine sahiptirler. Ancak, bu adaptasyon sürecinde büyümede kayıp olarak nitelenen enerji maliyeti söz konusudur. Adaptasyon kısa vadede etkili olup balığın hayatta kalma şansını artırmaktadır. Stresin kronik bir halde seyretmesi durumunda fizyolojik adaptasyon bir süre sonra iflas edebilir ve balık tolerans durumuna geçip hastalık ve diğer şoklara karşı tamamen dayanıksız hale gelebilir (Öğüt, 2005).

VHSV, Kuzey Amerika'da ilk kez 1988 yılında üremek için derelere geçiş yapan coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) balıklarının ovaryum sıvılarında bulundu (Brunson vd., 1989; Hopper, 1989). Daha sonraki yıllarda yapılan birçok çalışmada yine üreme döneminde örneklenen birçok balıktan VHSV izolasyonları gerçekleştirildi. Bunlardan özellikle herring balıkları (*Clupea palasii*) ile yapılan çalışmalardan birinde, bahar döneminde üremek için Norveç sularına gelen balıkların diğer balıklara göre daha yüksek

prevalens gösterdiği belirlendi (Johansen vd., 2011). Diğer bir çalışmada ise Prince William Sound (Alaska, USA) bölgesine üremek için gelen herring balıkları ağ kafeslerde stoklandı. Hem kafeslerdeki balıklardan hem de doğal stoklardan (her ikisi aynı sürünün balıkları) ayrıca hem kafes içerisinden ve etrafından hem de açık denizden su örnekleri alındı. Doğal stoklardan örneklenen balıklarda VHSV'ne rastlanmazken kafeslerde stoklanan balıklarda çok sayıda virüs izolasyonu gerçekleşti. Aynı şekilde kafes içi ve etrafından alınan su örneklerinde virüs tespit edilirken açık denizden alınan su örneklerinde virüs tespit edilemedi (Hershberger vd., 1999).

Bu çalışmada örneklenen birçok balığın gonad gelişimine bakılarak cinsiyeti belirlenebilecek durumda olduğu görüldü. Yani üreme dönemi (gonadların oluşmaya başlamasından yumurtaların dölllenmesine kadar olan süreç) başlamış durumdaydı. Bazı balıklarda gonad oluşumu yeni başlamışken bazı balıkların (sardalya, gelincik, kum kayabalığı) ise yumurta dökmek üzere oldukları görüldü. Üreme dönemi balıkların sürekli stres (üreme stresi) altında olduğu bir dönemdir ve bu süreçte balık patojenlere karşı daha savunmasız haldedir. Akçaabat ve Çamburnu istasyonlarından avlanan tüm gelincik balıklarının ve Çamburnu istasyonundan avlanan tüm sardalya balıklarının gonadlarının olgun olduğu ve üremek için kıyıya yakın bölgelerde buldukları görüldü. Bu balıklarda virüs prevalansının (gelincik; 9,72-100 ve sardalya; 2,09-16,27) diğer balıklara göre yüksek olması üreme stresinin virüs prevalansını artırdığını göstermektedir.

Balıklar güçlü yüzme yetenekleri sayesinde yaşamları boyunca aktif olarak yer değiştiren su canlılarıdır. Bazı türler aktif hareket etmekle birlikte yerleşik yaşamı tercih ettikleri halde çoğu balık grupları sürüler halinde uzun mesafeli göçler yaparlar. Balıklarda göçlere sebep olan başlıca faktörler fiziksel (Suyun derinliği, basıncı, akıntılar, ısı, ışık, yoğunluk), kimyasal (Tuzluluk, pH, çözülmüş gazlar, su kirliliği) ve biyolojik faktörler (üreme faaliyetleri, beslenme, kan basıncı, yırtıcılardan kaçma, sosyal rekabetler) şeklinde sıralanabilir (MEGEB, 2008).

Göç eden balıklar anadrom, katadrom, amfidrom ve oşinodrom olmak üzere 4 gruba ayrılır. Bunlardan anadrom balıklar büyüme ve gelişmelerini denizlerde tamamlar ve üreme olgunluğuna erişince yumurtlamak amacı ile iç sulara göç ederler. Katadrom balıklar ise anadrom balıkların tersine büyüme ve gelişmelerini tatlı sularda tamamlarlar ve yumurtlamak için denizlere göç ederler. Amfidrom balıklar durgun sularda, göl, gölet gibi ortamlarda yaşamlarını sürdürürler ve üreme dönemleri yaklaştığında durgun sulara bağlı

olan nehir ağızları ve nehirlere göç eder. Oşinodrom balıklar ise iç sulara girmeyen deniz balıklarıdır ve üremek için denizler arasında göç ederler (MEGEB, 2008).

Bu çalışmada örneklenen türlerden hamsi, istavrit ve çinekop balıkları oşinodrom türler olup beslenme, üreme ve sıcaklık ihtiyaçlarını karşılayabilmek için tüm Karadeniz’de sürüler halinde uzun göçler yaparlar. Çalışmada örneklenen diğer türler ise kısa mesafelerde göç ederler. Bu balıklar su sıcaklığının yüksek olduğu yaz aylarında derin sularda yaşarken su sıcaklığının düşmesi ile kıyıya yakın bölgelere gelirler. Nitekim Çamburnu istasyonunda (Yeniay limanı içerisinde) yapılan örneklemelemlerde çalışmada örneklenen bütün balık türlerinin aynı bölgede avlanabilmesi bu durumun bir göstergesidir. Bu durum VHSV’nün balıktan balığa transferinde önemli bir rol oynamaktadır. VHSV ile enfekte balıkların bu bölgelerde varlığı bu virüsün diğer balıklara bulaşmasına neden olabilmektedir. Bu bulaşma iki şekilde olabilir. Bunlardan birincisi enfekte balıkların üreme sıvısı ve idrar yoluyla virüsü çevreye (suya) bulaştırmaları, diğeri ise enfekte balıkların diğeri balıklar tarafından yenilmesidir.

Kahverengi alabalık ülkemizde doğal olarak bulunan tek alabalık türüdür. Anadolu’nun Kuzey ve Kuzey-Doğu Bölgesi’ndeki akarsularla, Karadeniz’e dökülen nehirlerde yaşadığı bildirilmektedir (Aras, 1976; Geldiay ve Balık, 1996). Kahverengi alabalık, tatlısu ve deniz (daha ziyade acısu) arasında fırsatçı göç davranışına sahiptir. Slastenenko (1956), Karadeniz alabalığının yurdumuzda birbirinden farklı üç ekotipinin var olduğunu (deniz, dere ve göl ekotipi) ileri sürmektedir. Bunlardan deniz ekotipi olan Karadeniz Alası (*Salmo trutta labrax*) hayatının büyük bir kısmını ve özellikle beslenme periyodunu içeren zamanı denizde geçirmektedir. Üreme dönemlerinde ise Karadeniz’e akan nehirlere girerek kış aylarında çakıllı ve taşlık alanlarda yumurtalarını bırakır. Tatlı sularda bırakılan yumurtalardan çıkan yavrular 15-20 cm boya erişince beslenmek üzere denize göç ederler (Slastenenko, 1956; Emre ve Kürüm, 1998).

Anadrom balıklardan bir diğeri olan tirsi balıkları *Clupeidae* familyasına dahildirler. *Alosa* cinsi ile temsil edilen tirsi balıkları ülkemiz denizlerinde Akdeniz, Ege, Marmara ve Karadeniz’de dağılım gösterirler (Akşiray, 1987). Morfolojik karakterine bakılarak yapılan çalışmalarda ülkemizde *alosa* cinsine ait dört tür (*A. caspia*, *A. maetoca*, *A. tanaica*, *A. pontica*) ve bir alt türün (*A. fallax nilotica*) bulunduğu belirtilmiştir (Bilecenoğlu vd., 2002; Kuru, 2004). Doğu Karadeniz’de (Azov Denizi ve Hazar Denizi’de dahil) dağılım gösteren türü *Alosa pontica*’dır (sinonim: *Alosa immaculata*) (Stoyanov vd., 1963; Kolarov, 1965;

Whitehead, 1985; Coad, 1997; Eryılmaz, 2001; Kottelat ve Freyhof, 2007; Turan vd., 2007).

Tirsi (*Alosa immaculata*) balıkları, ılıman ve nehir ağızlarına yakın sahalarda orta su bölgesinde büyük sürüler halinde bulunurlar. Yumurta bırakmak için acı su bölgelerine ve nehirlere girerler. Beslenmek için Doğu Karadeniz'i ve üremek için Danube, Dniester, Dnieper, Don, Bug ve Volga nehirlerini tercih ederler. Su sıcaklığının 6-9°C olduğu dönemlerde (Mart-Nisan) bu nehirlere girerler ve su sıcaklığının 15°C olduğu dönemlerde (Nisan-Ağustos) üreme başlar (Whitehead, 1985; Coad, 1997; Coad, vd., 2003; Navodaru ve Waldman, 2003; Ciolac, 2004; Kottelat ve Freyhof, 2007; Polat ve Ergün, 2008)

Kayabalığı türlerinden biri olan kum kayabalığı (*N. melanostomus*) diadrom türlere tipik bir örnektir. Birçok diadrom balık türü beslenmek için ortam değiştirir ve üreme faaliyetleri için mutlaka tatlı su yada deniz suyu ortamına ihtiyaç duyarken kum kayabalığı her iki ortama da tüm yaşam evreleriyle uyum sağlayabilmektedir (Hernaman vd., 2000).

Kum kayabalığı (*N. melanostomus*) eurytermal bir balık olup doğal ortamında, sıcaklık toleransı -1 ile 30°C arasındadır (Moskal'kova, 1996). Yayılış gösterdiği sulardaki tuzluluk değerleri 1-40.6 ppt arasında bulunmaktadır (Kazanchev, 1981). Karadeniz ve Azak denizinde 20 m'ye kadar olan sığ sularda, kumluk, kayalık ve çakıllık olan habitatları yaşam alanı olarak seçmektedirler (Miller, 1986). Karadeniz'de ilkbahar ve sonbahar aylarında yavaş akan nehirlerde, lagünlerde ve 20 m derinliğe kadar olan acı sularda bulunabilirler (Jude ve DeBoe, 1996), fakat kışın 50-60 m gibi daha derin sulara göç ederler (Miller, 1986).

Kum kayabalığı (*N. melanostomus*) Karadeniz, Azov ve Hazar denizi orijinlidir (Miller, 1986), fakat İstilacı karakteriyle geniş bir yayılım alanına ulaşmıştır. Marmara bölgesinde iç sularda Büyükçekmece baraj gölünde (Özuluğ, 1999) ve Sapanca gölünde (Özuluğ vd., 2007), Baltık denizi ve Kuzey Amerika'daki göller bölgesinde (Skora ve Stolarski, 1993; Jude vd., 1992) görüldüğü bildirilmiştir. Bu türün böylesine geniş bir yayılım alanına sahip oluşunun açıklaması, Avrupa'daki akarsuları izleyerek kuzeydeki Baltık denizine ulaştığı şeklindedir ve hala bu bölgedeki yayılımına devam ettiği düşünülmektedir. Kuzey Amerika'daki büyük göl sistemlerine ulaşması ise Baltık Denizi'ndeki Gdansk Körfezi'nden hareket eden gemilerin balast suları ile gerçekleştiği tahmin edilmektedir (Skora ve Stolarski, 1993; Corkum vd., 2004).

Çalışmada örneklenen ve VHSV için konak tür olduğu belirlenen balıklardan tirsi, kum kayabalığı, barbunya, mezigit, zargana, kurbağa balığı, iskorpit ve gelincik balıkları

çalışmanın yapıldığı kış aylarında nehir ağızlarında ve yakın çevresinde yoğun olarak bulunabilmektedir. Bu dönem ayrıca Karadeniz alabalıklarının göç zamanına (denizlerden derelere) denk gelmektedir. Olası bir kontaminasyonla birlikte VHSV Karadeniz alabalıklarına bulaşabilir ve bu balıkların göçlerinin tamamlandığı yere kadar tüm su kaynağı VHSV ile kontamine olabilir. Yine aynı şekilde enfekte alabalıklar, tirsi ve kum kayabalığı gibi tatlı sulara göç edebilen balıklar vasıtasıyla virüs tatlı su kaynaklarına bulaşabilir. Bu duruma Amerika'da göller bölgesinde 2005-2008 yılları arasında görülen VHS salgınlarında toplu balık ölümlerinin görülmesi örnek gösterilebilir. Amerika'da göller bölgesinde 2005-2008 yılları arasında VHSV (genotip-IVb) salgınlarından dolayı aralarında kum kayabalığının da (*Neogobius melanostomus*) bulunduğu toplu balık ölümleri görüldü. Kum kayabalığı, Karadeniz ve Hazar denizi için endemik bir türdür ve göller bölgesine (Kuzey Amerika) gemiler vasıtasıyla (balast sular ile) taşındığı, bölgeye adapte olduğu ve bölgede VHSV'nün yayılımında rol oynadığı söylenmektedir (Groocock vd., 2007; Lumsden vd., 2007).

4.1.4. Virüs Suşu

VHSV Avrupa izolatlarından tatlı su orijinli izolatlar (Ia, Ic, Id ve Ie) gökkuşağı alabalıkları için genellikle yüksek patojenite gösterirler fakat aynı izolatlar deniz balıklarında ya hiç patojenite göstermezler ya da düşük patojenite gösterirler. Diğer taraftan deniz orijinli VHSV izolatları genellikle genotip Ib, II ve III'e dahildirler ve gökkuşağı alabalıklarında ya hiç patojenite göstermezler ya da düşük patojenite gösterirler (Skall vd., 2004a). VHSV-Ie daha sonraki bölümlerde irdelenecektir (Bakınız; Bölüm 4.3.).

4.1.5. Beslenme

Balıkların da tüm diğer canlılar gibi, büyüme ve yaşamalarını devam ettirebilmeleri için besine ihtiyaçları vardır. Balık grupları çok çeşitli besin türleriyle beslenirler. Bazı balıklar yalnız bitkiler ve fitoplanktonla, diğerleri yalnız hayvansal gruplarla beslenir. Diğer üçüncü ve geniş bir grup ise hem hayvansal hem de bitkisel kaynakları tercih ederler. Pre ve post larva safhalarındaki genç balıkların büyük bir çoğunluğu, küçük bir ağza sahip olup, yumurta kesesi absorpsiyonunu takiben, plankton ve mikroskobik bitki ve

hayvanlarla beslenmeye başlarlar. Balıklar tarafından tüketilen hayvansal besinlerinin ilki planktonik organizmalardır (zooplanktondur). Zooplankton'a birçok farklı protozoan, mikrocrustacea ve diğer mikroskobik omurgasızlar ve birçok balığın yumurta ve larvaları dahildir (MEGEB, 2008). Balıklar ana besinlerinin yanında (balık, larva, vb.) ölerək dibe çökmüş her çeşit balık veya omurgasız varlıkları da tüketmektedir (Akşiray, 1987).

VHSV'nün balıktan balığa transferi konusunda beslenme önemli bir rol oynamaktadır. Bu transfer enfekte bir balığın diğer bir balık tarafından tüketilmesi (predasyon) ile olabileceği gibi, işlenmemiş balık materyallerinin doğrudan diğer balıkların (kültür balıkçılığında) beslenmesinde kullanılması ve genelde sportif balıkçılıkta kullanılan yem balıkları vasıtasıyla da olabilmektedir (Meyers vd., 1994; 1999; Meyers ve Winton, 1995; Dixon vd., 1997; Skall vd., 2005b; Kocan vd., 2001; Adelman vd., 2008; Faisal vd., 2012; Kahns vd., 2012; Amos ve Thomas, 2002; Raynard vd., 2007).

Meyers vd. (1999), Lisianski koyu (Pelican/Alaska) ve etrafındaki sularda yoğun balık ölümlerinin olduğu bir salgını araştırdılar. Balıklarda herhangi bir hastalık belirtisinin olmadığını ve su kalitesi parametrelerinin normal olduğunu tespit ettiler. Bölgeden toplanan ölü balıklardan (Pasifik herring (*Clupea pallasii*), Pasifik hake (*Merluccius productus*) ve Walleye pollock (*Theragra chalcogramma*)) aldıkları numuneleri viral örneklediler ve bu balıklardan Kuzey Amerika kökenli VHSV izole ettiler. Pasifik herring daha önce bölgede başka araştırmacılar tarafından da izole edilmiş ve bölgedeki virüs rezervi olduğu üzerinde durulmuştur (Meyers ve Winton, 1995; Amos vd., 1998). Hake ve pollock balıkları pelajik balıklardır ve besinleri arasında yine pelajik bir tür olan herring balıkları önemli bir yer tutmaktadır. Bu araştırmacılar, VHSV'nün hake ve pollock balıklarına ölü yada ölmek üzere olan enfekte herring balıkları ile beslenmesi sırasında bulaşmış olabileceği ihtimali üzerinde durmuşlardır (Meyers vd., 1999).

VHSV'nün balıktan balığa beslenme yoluyla bulaşması üzerine yapılan bir çalışmada, bir grup (16 adet) tiger mulluskenge (Northern Pike *Esox lucius* × Muskellunge *Esox masquinongy*) balığı VHSV ile enfekte edilen fathead minnows (*Pimephales promelas*) ve kömürcü kayası (*Gobius niger*) balıkları ile diğer bir grup (16 adet) tiger mulluskenge balığı ise enfekte olmayan fathead minnows balıkları ile beslenerek bir deneysel enfeksiyon çalışması yapıldı. Enfekte balıklarla beslenen 16 adet mulluskenge balıklarından 6 tanesinden VHSV izole edilirken, enfekte olmayan balıklarla beslenen mulluskenge balıklarında ise virüs izolasyonu gerçekleşmedi (Rodman vd., 2013).

Bu çalışmada örneklenen tüm balıklar hayatlarının larva döneminde planktonla beslenirler. Bu dönemden sonra besin gruplarında farklılaşmalar başlar. Özellikle hamsi, çaça, tirsi, istavrit, sardalya balıklarının ergin bireyleri genel olarak filtrasyonla sudaki planktonları süzerek beslenmeleri yanında kendinden daha küçük balık ve yumuşakça larvalarını da tüketebilmektedir (Whitehead, 1984a). Dolayısıyla beslenme yoluyla virüs transferi enfekte bir balığın diğer balık tarafından tüketilmesi yanında enfekte plankton ve krustaseaların tüketilmesi vasıtasıyla da olabilir. Göller bölgesinde (Great Lakes/USA) farklı noktalardan toplanan bir zooplanktondan (*Diporeia spp.*, Phylum: Arthropoda) (Faisal ve Winters, 2011) ve bir parazitik balık sülüğünden (*Myzobdella lugubris*, Phylum: Annelida) (Faisal ve Schulz, 2009) VHSV izolasyonları gerçekleştirilmiş ve her iki çalışmanın sonucunda da bu türlerin bölgede VHSV rezervuarı olabileceği ve virüsün yayılımında önemli bir rol alabileceği söylenmektedir. Bu çalışmada VHSV ile enfekte türlerden olan barbunya balıklarının pelajik olan genç bireyleri zooplanktonla erginleri ise poliketler, krustasealar, mollusklar ile beslenmektedir (Ivanov ve Beverton, 1985). Bu çalışmada örneklenen türlerden hamsi, çaça, sardalya, istavrit, tirsi, barbunya dışındaki balıklar karnivor türler olup kendinden daha küçük olan balıklarla beslenirler ve besinleri arasında ilk sıralarda hamsi, çaça ve istavrit balıkları yer almaktadır. Kurbağa balığı, iskorpit, kayabalıkları, gelincik gibi demersal balıklar taş ve kayaların arasında saklanarak avlanırlar ve hem pelajik türleri hem de diğer demersal türleri kolayca avlarlar. Demersal türlerde virüs prevalansının diğer türlere göre daha yüksek olması (Tablo 3) beslenme yoluyla virüs transferinin olabileceğini göstermektedir. Ülkemizde henüz planktonda yapılmış bir virüs tarama çalışması ve beslenme yoluyla virüs transferi konusunda yapılmış bir çalışma yoktur ve VHSV rezervuarlarının ve transfer mekanizmasının tespiti açısından bu tür çalışmalara ihtiyaç vardır.

4.2. VHSV İzolatlarının Genotiplerinin Belirlenmesi

VHSV Karadeniz’de ilk kez Gürcistan’da gökkuşağı alabalıklarından, ülkemizde ise Doğu Karadeniz Bölgesi’nde kalkan balıklarından izole edildi ve her iki izolatında genotip Ie’ye dahil olduğu bildirildi (Einer-Jensen vd., 2004; Nishizawa vd., 2006). Bu çalışmada, 12 farklı balık türünden toplam 74 adet VHSV izolatu elde edildi ve yapılan sekans analizleri sonucunda tüm izolatların VHSV genotip-Ie’ye dahil oldukları belirlendi. Bir çok laboratuvar tarafından yapılan sekans karşılaştırmaları genetik farklılıkların virüsün

izole edildiği yıl veya etkilediği türden daha ziyade coğrafik bölgeyle ilgili olduğunu söylemektedir (Skall vd., 2005b). Bu çalışmada elde edilen tüm izolatların aynı genogrup içerisinde olması bu söylemi bir kez daha doğrulamaktadır.

4.3.VHSV-Ie'nin Kültür Balıkları Üzerine Virülansının Belirlenmesi

Ülkemizde kültür balıkçılığında üretimi yapılan alabalıklar (Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax*), gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ve kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*)), çipura (*Sparus aureta*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) balıklarının VHSV-Ie suşuna duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla deneysel enfeksiyon çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalar sonucunda test edilen tüm balık türlerinin bu virüse karşı duyarlı oldukları belirlendi.

VHSV gökkuşağı alabalıklarında birçok araştırmacı (Jorgensen, 1992; Dixon vd., 1997; Quillet vd., 2001; Skall vd., 2004a; Chico vd., 2006; Nishizawa vd., 2006; Quillet vd., 2007; Brudeseth vd., 2008) tarafından deneysel çalışmalarda kullanıldı fakat kaynak alası ve Karadeniz'in doğusuna has bir tür olan Karadeniz alası balıklarında yapılmış deneysel bir çalışma mevcut değildir. Levrek balıklarında daha önce benzer bir çalışma Castric ve de Kinkelin (1984) tarafından yapılırken hem çipura hem de levrek balıklarında VHSV'nün (genotip II) virülansı Castric ve Jeffroy (1991) tarafından rapor edildi.

Bu çalışmada, alabalıklarla yapılan deneysel enfeksiyon çalışmalarında en yüksek ölüm oranı % 34 ile Karadeniz alabalıklarında görülürken, gökkuşağı ve kaynak alabalıklarında bu oranın %12 olduğu görüldü. Çipura ve levrek balıklarıyla yapılan deneysel enfeksiyon çalışmalarında ise en yüksek ölüm oranlarının çipuralarda %15, levreklerde ise %25 olduğu görüldü. Bu oranlara bakılarak VHSV-Ie suşunun bu balık türlerine virülansı düşük seviyelerde olduğu görülmektedir.

Deneysel enfeksiyon çalışmalarında tanklardan alınan ölü balıklarda çipura ve levreklerde VHS'nin herhangi bir klinik belirtisine rastlanmazken, alabalıklarda (her üçünde de) birbirlerine benzer şekilde deride hemorajlar, göz firlaklığı, renkte koyulaşma, anüs çevresinde kızarıklık ve balığın baş kısmında bir baloncuk oluşması gibi daha önceden başka araştırmacılar tarafından da (Wolf, 1988; McAllister, 1990) belirtilen birçok klinik belirti görüldü (Şekil 6, 8, 10).

Deneysel çalışmalarda kullanılan VHSV-Ie suşu (MM1207) deniz kökenlidir ve mezgıt balıklarından izole edilmiştir. Çalışmada kullanılan alabalık türlerinden gökkuşağı

ve kaynak alabalıkları hayatlarının tamamını tatlı suda geçirirler. Karadeniz alabalıkları ise anadromdurlar ve yumurta-kuluçka dönemlerini tatlı suda geçirdikten sonra hayat döngüleri gereği denizlere göç ederler. VHSV-İe suşunun virülenliğinin Karadeniz alabalıklarında (% 34) gökkuşığı ve kaynak alabalıklarına (% 12) göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

Virüs genotipi, yaş, tür, stres ve çevresel faktörler gibi birçok faktör konak balık türünün VHSV'ne duyarlılığını etkilemektedir (Hedrick vd., 2003; Skall vd., 2005a). Nükleoprotein ve Glikoprotein sekans analizine dayalı olarak VHSV'nün dört genotipi olduğu bildirilmektedir (Snow vd., 1999; Einer-Jensen vd., 2004). Gökkuşığı alabalığı, Kuzey Avrupa'da deniz balıklarından izole edilen VHSV izolatlarına duyarlı değilken Kuzey Amerika'da deniz balıklarından izole edilen VHSV izolatlarına karşı duyarlıdır ve banyo yöntemiyle yapılan deneysel çalışmalarda %20'lere kadar ölümler gerçekleşmiştir (Dixon vd., 1997; Skall vd., 2004a; Winton vd., 1991; Follett vd., 1997; Meyers ve Winton, 1995; Traxler vd., 1995.). Diğer taraftan Avrupa'da tatlı sulardan izole edilen VHSV izolatlarının ise deneysel bir çalışmada gökkuşığı alabalıklarında %50-100 ölümlere sebep olduğu bildirilmektedir (Skall vd., 2004a).

Tatlı su balıklarından izole edilen VHSV suşlarının yine tatlı su balıklarına yüksek patojenite gösterdiği, deniz balıklarına ise düşük patojenite gösterdiği ya da hiç patojenite göstermediği ve bu durumun tersi durumlar (deniz balıklarından izole edilen VHSV izolatlarının tatlı su balıklarına düşük patojenite gösterdiği) birçok çalışmada ortaya konuldu (Skall vd., 2004a; Jorgensen, 1992; Dixon vd., 1997; King vd., 2001a; Gadd, 2013). Bunlardan Skall vd. (2004a) tarafından yapılan bir çalışmada, gökkuşığı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) (0,6-6,2 g) immersiyon (banyo) ve enjeksiyon yöntemleriyle doğal deniz balıklarından izole edilen 139 adet (115 adet Avrupa denizlerindeki doğal balıklardan, 2 adet İskoçya ve İrlanda'da kültürü yapılan kalkan balıklarından ve 22 adet kültürü yapılan gökkuşığı alabalıklarından) viral hemorajik septisemi virüsüne karşı duyarlılıkları belirlendi. Çalışma sonucunda, doğal deniz balıklarından elde edilen bazı VHS izolatları ile banyo yöntemiyle yapılan deneysel enfeksiyon çalışmalarında balık ölümleri görülmezken bazı izolatların % 5-13 ölümlere neden olduğu görüldü. Diğer taraftan, kültürü yapılan gökkuşığı alabalıklarından elde edilen tüm izolatların banyo yöntemiyle yapılan deneysel enfeksiyonlarda önemli derecede ölümlere neden olduğu görüldü. Kültürü yapılan kalkan balıklarından elde edilen 2 izolat ile yapılan deneysel enfeksiyonlarda ise yine balık ölümleri görülmedi.

Diğer bir çalışmada 7,1 g ağırlığındaki gökkuşaağı alabalıkları VHSV-Ia (DK-3592B tatlı sularda yaşayan gökkuşaağı alabalıklarından izole edildi) izolatına hem enjeksiyon hem de banyo yöntemiyle maruz bırakıldı ve ölüm oranlarının % 98-100 olduğu görüldü. Aynı balıklara deniz balıklarından izole edilen izolatlar (VHSV-II (DK-1p53) ve FI-lamprey 743.03) uygulandığında ise balık ölümlerinin olmadığı görüldü (Gadd, 2013).

Bu çalışmada, gökkuşaağı alabalıkları ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışması Skall vd. (2004a) tarafından yapılan çalışma ile bazı yönlerden benzerlik göstermektedir ve besin kesesini henüz tüketmiş gökkuşaağı alabalıklarının yeme alıştırtılmasından hemen sonra deneylerde kullanılması yönüyle diğer çalışmalardan ayrılmaktadır. Her iki çalışmada da deniz kökenli VHSV izolatları birbirine yakın büyüklükteki balıklara banyo yöntemiyle uygulandı ve en yüksek ölüm oranlarının yine benzer şekilde % 12-13 olduğu görüldü.

Alabalıklarla yapılan deneysel enfeksiyon çalışmalarında 4 farklı doz grubu (H: en yüksek doz, M: yüksek doz, L: düşük doz ve LL: en düşük doz) oluşturulurken çipura ve levrek balıkları ile yapılan çalışmalarda ise 3 farklı doz grubu (H: en yüksek doz, M: yüksek doz, L: düşük doz) oluşturuldu. Karadeniz ve gökkuşaağı alabalıklarına uygulanan tüm doz gruplarında ($10^{2,9}$ - $10^{6,2}$ TCID₅₀ ml⁻¹) virüs kaynaklı balık ölümleri görülürken kaynak alabalıklarında uygulanan L ve LL doz gruplarında ($10^{2,4}$ ve $10^{3,4}$ TCID₅₀ ml⁻¹) virüs kaynaklı balık ölümleri görülmedi (Ek tablo 4). Kaynak alabalıklarına uygulanan L dozu, Karadeniz ve gökkuşaağı alabalıklarına uygulanan LL ($10^{2,9}$ ve $10^{3,2}$) dozlarından daha yüksek virüs konsantrasyonuna sahip olmasına rağmen bu iki türde virüs kaynaklı balık ölümleri görülürken kaynak alabalıklarında balık ölümleri görülmedi. Bu durum kaynak alabalıklarının enfekte edecek minimum virüs konsantrasyonunun $10^{3,4}$ TCID₅₀ ml⁻¹ den fazla ve Karadeniz ve gökkuşaağı alabalıklarına göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Çipura balıklarına uygulanan L dozu ($10^{2,1}$ TCID₅₀ ml⁻¹) tüm deneysel çalışmalarda uygulanan en düşük virüs konsantrasyonuna sahip olmasına rağmen çipura balıklarında % 5 oranında ölüme sebep olduğu görülmektedir. Levrek balıklarında ise % 5 ölüm oranı yine L doz grubunda ($10^{4,3}$ TCID₅₀ ml⁻¹) görüldü fakat bu doz grubundaki virüs konsantrasyonu çipuradakinden 100 kat daha fazladır.

VHS hastalığında yaş, patojeniteyi ve hastalığın seviyesini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Gökkuşaağı alabalıkları için 0,3-3,0 g (ilk 5-6 ay) büyüklükteki dönem VHSV'ne en duyarlı olduğu dönemdir. Bu dönemdeki balıklarda 9-12°C su sıcaklığında

%80-100 ölümler görülebilirken daha büyük balıklarda, aynı şartlarda, ölüm oranları önemli ölçüde azalır (Smail, 1999).

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde doğal kalkan balıklarından ve kültürü yapılan kalkan balıklarından izole edilen VHSV izolatları (TR-WS13G ve TR-Bs13/15H) Gürcistan'da gökkuşağı alabalığından izole edilen izolata % 98 benzerlik göstermektedir ve genotip Ie içerisinde yer almaktadır. TR-WS13G izolatu ile 15 günlük kalkan larvalarında ve 146 günlük (4 cm boyunda) gökkuşağı alabalıklarında deneysel enfeksiyon çalışmaları yapıldı. Kalkan balıklarına banyo yöntemiyle 10^3 TCID₅₀ ml⁻¹ virüs uygulandı ve %7-23 balık ölümleri görüldü. Gökkuşağı alabalıklarına ise intraperitoneal enjeksiyon yöntemiyle $10^{6.1}$ TCID₅₀/100µl/balık virüs enjekte edildi ve 14 gün boyunca takip edildi. Deney süresince gökkuşağı alabalıklarında virüs kaynaklı balık ölümleri görülmedi (Nishizawa vd., 2006).

Bu çalışmada $0,17 \pm 0,07$ g ağırlığındaki gökkuşağı alabalıklarına banyo yöntemiyle uygulanan $10^{4.9}$ TCID₅₀ ml⁻¹ virüs konsantrasyonunda %12 balık ölümleri görülürken Nishizawa vd. (2006) yaptığı çalışmada $10^{6.1}$ TCID₅₀ ml⁻¹ virüs konsantrasyonu intraperitoneal enjeksiyon yöntemiyle uygulandı ve balık ölümleri görülmedi. Bu çalışma ile Nishizawa vd. (2006) yaptığı çalışma sonuçlarındaki farklılıkların çalışmada kullanılan balıkların yaş farkından dolayı bağışıklık sistemlerindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Nishizawa vd. (2006) yaptığı çalışmada kullanılan alabalıkların (146 günlük, yaklaşık 5 aylık) bağışıklık sistemleri daha gelişmiştir ve VHSV'ne karşı daha dirençli oldukları söylenebilir.

Yaş arttıkça VHSV'ne karşı direncin arttığını ortaya koyan bir durum Isshiki vd. (2001) yaptığı bir çalışmada da görülmektedir. 1996 yılının bahar aylarında (su sıcaklığı 8-15°C) Japonya'da pisi (*Paralichthys olivaceus*) balığı yetiştiriciliği yapan iki işletmede % 50-70'lere kadar varan balık ölümleri görüldü ve bu balıklardan VHSV (KRRV-9601) izole edildi. Bu izolatla yapılan deneysel enfeksiyon çalışmasında 3 farklı büyüklükteki (küçük: 14 g, orta: 124 g ve büyük: 1059 g) pisi balıkları 10 ± 1 °C su sıcaklığında 15-60 gün süreyle KRRV-9601 izolatına maruz bırakıldı. 60 gün boyunca kontrol tanklarında balık ölümü görülmezken küçük balıkların olduğu grupta (15. gün sonunda) ve orta boy balıklarda (24. gün sonunda) %100 balık ölümleri görüldü. Büyük balıkların olduğu grupta ise kümülatif balık ölümlerinin %60 olduğu görüldü.

Diğer bir çalışmada gökkuşağı alabalıklarından izole edilen Finlandiya izolatu (VHSV-Id) kullanılarak intraperitoneal enjeksiyon yöntemiyle yapılan deneysel çalışmada

1,6 gram ağırlığındaki balıklarda %81 balık ölümleri görülürken aynı izolat aynı büyüklükteki balıklara banyo yöntemiyle uygulandığında ölümlerin yaklaşık %38 olduğu görüldü. Aynı deneysel çalışma 7,1 gram ağırlığındaki gökkuşuğu alabalıkları ile yapıldığında ölüm oranları intraperitoneal enjeksiyon yönteminde % 66, banyo yönteminde ise %13 olarak görüldü (Gadd, 2013).

VHS salgınlarında su sıcaklığı önemli bir çevresel faktördür. Hastalık daha çok 4-14°C su sıcaklıklarında görülür. Replikasyon için optimum su sıcaklığı 9-12°C'dir ve 15°C'nin üzerindeki sıcaklıkların virüsün çoğalması üzerine olumsuz etkileri olduğu bildirilmektedir. Replikasyon 6°C de çok azdır ve 20°C de hiç yoktur (de Kinkelin vd., 1980; Bernard vd., 1983; McAllister, 1990).

Goodwin ve Merry (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, mavi solungaç balıkları ile (*Lepomis macrochirus*) 10-30°C arasında değişen 6 farklı sıcaklıkta VHSV genotip-IVb kullanılarak intraperitoneal enjeksiyon yöntemiyle deneysel enfeksiyon çalışması yapıldı. Çalışma sonucunda, 10°C su sıcaklığında yapılan deneyde balıkların %90, 14°C de %35, 18°C de %10 oranlarında öldüğü ve 22-30°C de yapılan deneysel çalışmalarda ise balık ölümlerinin olmadığı görüldü.

Bu çalışmada, alabalıklarla yapılan deneysel enfeksiyon çalışmaları 12°C su sıcaklığında yapıldı. Çipura balıklarında ise deneysel çalışma 12°C'de başladı ve 16. günde su sıcaklığının 15°C'nin üzerine çıkmasıyla sonlandırıldı. Levrek balıklarında ise iki farklı uygulama yapıldı. Bunlardan birincisinde deneysel çalışma 16°C, diğesinde ise 12°C su sıcaklığında yapıldı. Burada 12°C su sıcaklığı VHSV için optimum replikasyon sıcaklığı, 16°C ise Ege Bölgesi'nde çipura ve levrek kuluçkahanelerinde kullanılan en düşük su sıcaklığına tekabül etmektedir.

Levrek balıklarında 16°C su sıcaklığında yapılan deneysel çalışmada 7 gün süresince virüs kaynaklı balık ölümleri görülmezken 12°C de yapılan çalışmada virüs kaynaklı ilk balık ölümü deneyin 4. gününde görüldü. Benzer şekilde 12°C'de yapılan diğer deneysel çalışmalarda da virüs kaynaklı ilk balık ölümleri çipura balıklarında 4. günde alabalıklarda ise 5. ve 6. günlerde görüldü. Levrek balıklarında 16°C de yapılan deneysel çalışmada balık ölümlerinin görülmemesi VHSV-Ie'nin (MM1207) 15°C ve üzeri su sıcaklıklarında enfektivitesini kaybettiğini göstermektedir.

Ege bölgesinde çipura ve levrek kuluçkahanelerinde kullanılan su sıcaklığı yaklaşık 16°C'dir. Yapılan deneysel çalışmalarda 16°C su sıcaklığında viral replikasyonun olmadığı

görülmektedir. Dolayısıyla VHSV-İe Ege Bölgesi'nde levrek kuluçkahanelerinde bir risk olarak görülmemektedir. Diğer taraftan, Doğu Karadeniz Bölgesi şartlarında çipura ve levrek kuluçkahaneleri kurulmak istenirse mutlaka su sıcaklığı sürekli olarak 16°C'nin üzerinde tutulmalıdır. Bu durum üretim maliyetlerini önemli derecede artıracaktır.

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde deniz kafeslerinde üretim yapan işletmelerde ağırlıklı olarak gökkuşağı alabalığı ve Karadeniz alabalığı üretilmektedir. Bu üretim balıkların deniz suyu sıcaklığının azalmaya başlayarak 18°C'nin altına düştüğü Ekim-Kasım aylarında tatlı sudan denize transfer edilmesi, burada kafeslerde büyütülerek Mayıs-Haziran aylarında (su sıcaklığının artmaya başlayarak 18°C'nin üzerine çıkması) pazara sunulması şeklinde yapılmaktadır. Pazara sunulamayan balıklar ise tekrar tatlı sulara transfer edilmektedir. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde denizde kurulmuş işletmelerde kafeslerde alabalıkların yanında önemli miktarlarda levrek ve az da olsa çipura üretimi de yapılmaktadır ve aynı işletmedeki tüm balıklar (alabalıklar, çipura ve levrek) yan yana kafeslerde bir arada tutulmaktadır. VHSV Doğu Karadeniz Bölgesi'nde doğal balık türlerinde endemiktir ve birçok balık türü kafeslerin çevresinde bulunmakta hatta tirsî, istavrit, hamsî, sardalya vb. VHSV'ne duyarlı pelajik türler kafes içerisine dahi girebilmektedir. Bu durum VHSV'nün doğal balıklardan kültür balıklarına ve/veya kültür balıklarından doğal balıklara ve hatta kültür balıklarından birbirlerine virüs transferini mümkün kılmaktadır. Dolayısıyla deniz kafeslerinde üretilen ve pazara sunulamayan kültür balıkları kesinlikle iç sulara ve diğer bölgelere transfer edilmemelidir. Aksi takdirde VHSV iç sularda yayılarak gerek nehir ve göllerdeki doğal balıklarda gerekse kültür balıkçılığı yapan işletmelerde virüs salgınlarına neden olabilecektir. Buna benzer bir durum Kuzey Amerika'da göller bölgesinde 2005-2008 yılları arasında görüldü ve 25 farklı balık türünde VHSV salgınları nedeniyle yoğun balık ölümleri ile sonuçlandı. Bu durumdan Doğu Karadeniz Bölgesi'nde ve Hazar Denizi'nde endemik olan ve VHSV ile enfekte kum kayası balığının (*Neogobius melanostomus*) gemiler vasıtasıyla göller bölgesine taşınması, burada yerleşmesi ve iç kesimlere kadar yayılması ve dolayısıyla bölgeye virüsü yayması sorumlu tutulmaktadır (Grocock vd.,2007; Lumsden vd., 2007).

4.4. EPC ve BF-2 Hücre Hatlarının VHSV'ne (İe) Duyarlılıkları

İki farklı hücre hattının (EPC ve BF-2) VHSV'ne (MM1207, genotip-İe) karşı duyarlılıklarının karşılaştırılması amacıyla yapılan bu çalışmada hücre hatlarının 7 günlük

süreyle ürettikleri virüs miktarları günlük olarak izlendi. Her iki hücre hattında da sitopatik etkiler (CPE) ikinci günde görülmeye başladı. Fakat dördüncü günde BF-2 hücrelerinde hücrelerin % 35-40'ı (titer; $10^{7,39}$ TCID₅₀ ml⁻¹) zeminden ayrılırken aynı gün EPC hücrelerinde hücrelerin tamamının (titer; $10^{8,88}$ TCID₅₀ ml⁻¹) zeminden ayrıldığı görüldü. Deneyin sonunda (7.gün) üretilen virüs miktarının BF-2 hücrelerinde $10^{7,48}$ TCID₅₀ ml⁻¹ iken EPC hücrelerinde $10^{9,06}$ TCID₅₀ ml⁻¹ olduğu görüldü.

Avrupa Birliği komisyon kararlarına göre (E.C., 1996) balıkların VHSV ile enfekte olup olmadığını belirlemek amacıyla hücre kültüründe virüs izolasyonu ilk basamaktır ve zorunludur. BF-2 (Bluegill Fry), CHSE-214 (Chinook Salmon Embrio), EPC (Epithelioma Populosum Cyprini), FHM (Fathead Minnow) ve RTG-2 (Rainbow Trout Gonad) bu amaçla en çok kullanılan hücre hatlarıdır (Lorenzen vd., 1999) ve bu hücre hatlarının hangisinin VHSV izolasyonu için en uygun olduğu konusunda halen tartışmalar devam etmektedir.

Olesen ve Jorgensen (1992) BF-2, EPC ve CHSE-214 hücre hatlarının Danimarka'da tatlı suda yetiştiriciliği yapılan alabalıklarından izole edilen VHSV'ne karşı duyarlılıkları ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, bu virüse en duyarlı hücre hattının BF-2 olduğu ve bu hücre hattının CHSE-214 hücre hattından 10 kat ve EPC hücre hattından 20 kat daha duyarlı olduğu belirlendi.

Lorenzen vd. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, 11 farklı referans laboratuvarı tarafından 5 farklı hücre hattının (BF-2, EPC, CHSE-214, FHM ve RTG-2) 3 farklı patojenik balık virüsüne (VHSV, IPNV ve IHNV) duyarlılıkları karşılaştırıldı. Çalışma sonucunda, VHSV (genotip I ve III) için BF-2 hücre hattının en yüksek, EPC hücre hattının ise en düşük duyarlılıkta olduğu, IHNV (İnfeksiyöz Hematopoetik Nekrozis Virüsü) için EPC ve FHM hücre hatlarının ve IPNV (İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis Virüsü) için BF-2 ve CHSE-214 hücre hatlarının en duyarlı hücre hatları olduğu belirtilmektedir.

Avrupa'da (tatlı sularda) yapılan virüs izolasyon çalışmalarında genellikle VHSV için BF-2 hücre hattı kullanılırken Amerika ve Kanada'da (denizlerde) yapılan çalışmalarda EPC hücre hattı kullanılmakta ve kullanılması tavsiye edilmektedir (Ariel vd., 2009). Bu çalışmada, doğal deniz balıklardan izole edilen VHSV (genotip-Ie) için EPC hücre hattı BF-2 hücre hattına göre daha duyarlıdır ve bu durum Ariel vd. (2009) yaptığı çalışma ile örtüşmektedir.

5. SONUÇLAR

- Balıkların örneklendiği tüm istasyonlarda VHSV izolasyonları gerçekleşti. Örneklenen 18 farklı balık türünden 12 tanesinin VHSV taşıyıcısı olduğu ve dolayısıyla bu virüsün Doğu Karadeniz Bölgesi'nde endemik olduğu belirlendi.
- Mezgit balıklarında yapılan VHSV taramasında bireysel olarak örneklenen balıklardan 1-2 yaş aralığında olanların bu virüse daha duyarlı olduğu ve bu yaş aralığının mezgit balıkları için ilk üreme dönemine tekabül ettiği görüldü.
- Gelincik ve sardalya balıklarınının kış aylarında üremek (yumurta dökmek) için sahile yakın kesimlere geldiği ve bu balıklarda virüs prevalansının daha yüksek olduğu görüldü. Bu durum üreme stresinin virüs prevalansını artırdığını göstermektedir.
- Virolojik örnekleme sırasında balıkların gözle muayenesi sonucunda balıklarda herhangi bir VHSV belirtisine rastlanmadı. Bu durum VHSV enfekte balıkların asemptomatik taşıyıcı olduklarını göstermektedir.
- Perşembe istasyonunda doğadan avlanarak deniz kafeslerinde stoklanan istavrit balıklarında görülen yoğun ölümler diğer patojenlerin varlığı ve aşırı stres gibi etkenlerin birlikte bulunduğu durumlarda deride lezyonlar ve kanamalar (hemoraj) gibi klinik belirtiler göstererek bu balıkların ölümünde VHSV'nün rol oynayabileceğini göstermektedir.
- Doğal balıklardan elde edilen toplam 74 adet VHSV izolatının tamamı VHSV genotip 1e'ye dahildir ve daha önce Karadeniz'den izole edilen izolatlarla % 99'un üzerinde benzerlik göstermektedir.
- Kültür balıkları ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışmaları sonucunda deneylerde kullanılan tüm balıkların VHSV'ne duyarlı olduğu belirlendi. Deneysel çalışmalarda en yüksek ölüm oranı Karadeniz alabalıklarında görülürken (% 34) bunu sırasıyla levrek (% 25), çipura (% 15), gökkuşuğu ve kaynak alabalıkları (% 12) izlemektedir.
- Alabalıklar ile yapılan deneysel enfeksiyon çalışmalarda ölen balıklarda deride hemorajlar, göz firlaklığı, renkte koyulaşma, anüs çevresinde kızarıklık ve balığın baş kısmında bir baloncuk oluşması gibi VHSV klinik belirtileri görüldü.
- VHSV izolasyonlarında EPC hücre hattının BF-2 hücre hattına göre daha duyarlı olduğu belirlendi.

6. ÖNERİLER

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde deniz kafeslerinde alabalık yetiştiriciliği balıkların Ekim-Kasım aylarında kafeslere taşınması, burada Mayıs-Haziran ayına kadar büyütülerek pazara sunulması, pazara sunulamayan balıkların ise iç sulardaki (dere, baraj, göl) işletmelere taşınması şeklinde yapılmaktadır ve bu balıkların bir kısmı anaç olarak kullanılmaktadır. Deneysel çalışmalar ışığında alabalıkların VHSV duyarlı oldukları belirlenmiştir. Dolayısıyla bu balıklar arasında VHSV taşıyıcısı balıkların bulunabileceği ve balık transferi ile birlikte virüs transferinin de gerçekleşeceği gerçeği dikkate alınmalıdır. Bu yüzden denizlerden iç sulara balık transferi yapılmamalıdır.

Yomra koyunda deniz kafesleri etrafında yapılan mezgıt örneklemeleri sırasında aynı noktadan mezgıt ile birlikte istavrit, sardalya ve tirsi balıkları da avlanılmıştır. Bu balıkların zaman zaman kafeslerin içerisine girdiği de bilinmektedir. Bu balıkların yapılan çalışmada VHSV konakçısı olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla bu balıkların kafeslerde yetiştiriciliği yapılan ve VHSV'ne duyarlı olduğu belirlenen alabalıklar, çipura ve levrek balıklarına virüs bulaştırabileceği unutulmamalı, kafes içerisinde görüldüğünde ise mutlaka uzaklaştırılmalıdır.

Denizlerde kurulu kafes işletmelerinde genelde tüm türler (alabalık, çipura, levrek, vd..) yan yana kafeslerde bir arada tutulmaktadır. Hatta Perşembe istasyonunda görüldüğü gibi bazen doğal balıklar avlanarak yine bu kafeslerde bir süre stoklanmaktadır. Olası bir kontaminasyonda enfekte doğal balıklardan virüs bulaşabileceği gibi başka patojenler de (bakteri, parazit, vs.) bulaşabilecektir. Bu yüzden doğadan avlanan balıklar ile kültür balıkları bir arada tutulmamalıdır.

Gemiler, balast suları vasıtasıyla birçok canlıyı ve patojeni bir bölgeden diğer bir bölgeye taşımaktadır. VHSV ile ilgili böyle bir duruma Amerika'da göller bölgesinde enfekte kum kayası balıklarının (*Neogobius melanostomus*) bölgeye yerleştiği ve VHSV'nü yaymış olabileceği ve salgınlarla birlikte birçok balık türünde toplu ölümlere sebebiyet verdiği bir olay örnek gösterilebilir. Bu tür olayları engellemek amacıyla gemilerin balast tanklarına doldurulan sular dezenfekte edilmelidir.

Doğu Karadeniz’de çipura ve levrek yetiştiriciliği Marmara ve Ege Bölgesi’ndeki kuluçkahanelerden transfer edilen birkaç aylık yavruların deniz kafeslerinde büyütülerek pazara sunulması şeklinde yapılmaktadır. Son dönemlerde bazı işletmeler yavru balık transfer etmek yerine kendi kuluçkahanelerini kurmak istemektedirler. Karadeniz şartlarında çipura ve levrek balıklarının üreme sezonunda su sıcaklığı 7-8°C’lere kadar düşmektedir ve 16°C’nin altındaki su sıcaklıklarında VHSV bu balıklarda ölümlere neden olabilir. Bu durumda su sıcaklığının mutlaka sürekli olarak 16°C’nin üzerinde tutulmasına dikkat edilmesi gerekir. Bu durum üretim maliyetlerini önemli derecede artıracaktır. Bu yüzden “yavru balık ihtiyacı üretimle mi yoksa diğer bölgelerdeki kuluçkahanelerden transferle mi sağlanmalı” konusu detaylıca irdelenmelidir.

Birkaç yıl öncesine kadar VHSV’nün ülkemiz sularında varlığı bilinmiyordu. VHSV İlk kez 2004 yılında Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından üretilen kalkan balıklarında görüldü. Daha sonra, Işidan (2010) tarafından Karadeniz’de doğal balıklarda bir VHSV tarama çalışması yapıldı ve sadece kalkan balıklarından virüs izolasyonu gerçekleşti. Bu çalışmada ise Doğu Karadeniz’de 18 farklı balık türünde VHSV taraması yapıldı ve 12 balık türünden bu virüs izole edildi. Bu tür çalışmalar ile birlikte VHSV gibi dünya genelinde akuakültür endüstrisinde önemli maddi kayıplara neden olan bir balık patojeni hakkında yeni bulgular elde edilmektedir. Bu tür çalışmaların diğer bölgelerde ve diğer önemli balık virüsleri içinde yapılması ülkemiz su kaynaklarının, doğal balıkların ve kültür balıkçılığının sürdürülebilir olması açısından son derece önemlidir.

7. KAYNAKLAR

- Acosta, F., Petrie, A., Lockhart, K., Lorenzen, N. ve Ellis, A., E., 2005. Kinetics of Mx Expression in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) Parr in Response to VHS-DNA Vaccination, Fish and Shellfish Immunology, 18, 81-89.
- Adelmann, M., Köllner, B., Bergmann, S., M., Fischer, U., Lange, B., Weitschies, W., Enzmann, P., ve Fichtner, D., 2008. Development of An Oral Vaccine for Immunisation of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Against Viral Haemorrhagic Septicaemia, Vaccine, 26, 837-844.
- Ahne, W., 1981. Serological Techniques Currently Used in Fish Virology, Developments in Biological Standardization, 49, 327.
- Ahne, W., 1982. Vergleichende Untersuchungen Über die Stabilität von Vier Fischpathogenen Viren (VHSV, PFR, SVCV, IPNV), Zentralbr Veteriaermed B., 29, 457-476.
- Akşiray, F., 1987. Türkiye Deniz Balıkları ve Tayin Anahtarı, İ.Ü Rektörlüğü Yayınları, 2. Baskı. No: 3490, İstanbul, 811 s.
- Altuntaş, C., 2007. Viral Hemorajik Septisemi (VHS) Virüsünün Trabzon, Yomra Koyunda Mezgıt (*Merlangius merlangus euxinus*) Populasyonunda Yayılımı, Mevsimselliği ve Kültür Balıkçılığına Etkisinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Altuntaş, C. ve Öğüt, H., 2010. Monthly Occurrence and Prevalence of Viral Haemorrhagic Septicemia Virüs (VHSV) in Whiting *Merlangius merlangus*, Diseases Of Aquatic Organisms, 88, 107-113.
- Amos, K, Thomas, J., ve Hopper, K., 1998. A Case History of Adaptive Management Strategies for Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) in Washington State, J. of Aquat Anim. Health, 10, 152-159.
- Amos, K. ve Thomas, J., 2002. Disease Interactions Between Wild and Cultured Fish: Observations and Lessons Learned in The Pacific Northwest, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 22 (2), 95-102.
- Aras, M., S., 1976. Çoruh ve Aras Havzası Alabalıkları Üzerine Biyo-Ekolojik Araştırmalar, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 7, 1-16.
- Ariel, E., Skall, H., F. ve Olesen, N., J., 2009. Susceptibility Testing of Fish Cell Lines for Virus Isolation, Aquaculture, 298, 125-130.

- Barton, B., A. ve Iwama, G., K., 1991. Physiological Changes in Fish from Stress in Aquaculture with Emphasis on The Response and Effects of Corticosteroids, Ann. Rev. Fish Dis., 1, 3–26.
- Bernard, J., de Kinkelin, P. ve Bearzotti-Le, B., M., 1983. Viral Hemorrhagic Septisemia of Rainbow Trout: Relation Between The G Polypeptide and Antibody Production in Protection of The Fish After Infection with The F25 Attenuated Variant, Infection and Immunity, 39, 7–14.
- Besse, P., 1955. Recherche sur L'etiologie de L'anemie Infectieuse de la Truite, Bulletin de L'Academie Veterinaire de France, 5, 194–198.
- Bilecenoğlu, M., Taşkavak, E., Mater, S. ve Kaya, M., 2002. Checklist of The Marine Fishes of Turkey, Magnolia Press, Auckland, New Zealand, Zootaxa, 113, 194 p.
- Brudeseth, B., E. ve Evensen, Ø., 2002. Ocuurence of Viral Haemorrhagic Septicemia Virüs (VHSV) in Wild Marine Fish Species in The Coastal Regions Of Norway, Diseases of Aquatic Organisms, 52; 21-28.
- Brudeseth, B., E., Castaric, J. ve Evensen, Ø., 2002. Studies on Pathogenesis Following Single and Double Infection with Viral Hemorrhagic Septicemia Virus and Infectious Hematopoietic Necrosis Virus in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Veterinary Pathology, 39, 180-189.
- Brudeseth, B., E., Skall, H., F. ve Evensen, O., 2008. Differences in Virulence of Marine and Freshwater Isolates of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus in vivo Correlate with in vitro Ability to Infect Gill Epithelial Cells and Macrophages of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), J. Virology, 82,10359-10365.
- Brunson, R., True, K. ve Yancey, J., 1989. VHS Virus Isolated at Makah National Fish Hatchery, American Fisheries Society Fish Health Section Newsettler, 17, 3–4.
- Campbell, J., B. ve Wolf, K., 1969. Plaque Assay and Some Characteristics of Egtved Virus (Virus of Viral Hemorrhagic Septicemia of Rainbow Trout), Can. Journal of Microbiology, 15, 635–637.
- Castric J., de Kinkelin P., 1984. Experimental Study of The Susceptibility of Two Marine Fish Species, Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*), to Viral Haemorrhagic Septicaemia, Aquaculture, 41 (3): 203–212.
- Castric, J. ve Jeffroy, J., 1991. Experimentally Induced Diseases in Marine Fish with IHNV and A Rhabdovirus of Eel, In: De Pauw, N., Joyce, J. (Eds.) Aquaculture and The Environment, European Aquaculture Society Special Publication No. 14, Bredene, Belgium.
- C.F.S.P.H., 2003. Viral Hemorrhagic Septicemia, Center for Food Securty and Public Health, Ames, Iowa, 3 s.

- Chico, V., Gomez, N., Estepa, A., Perez, L., 2006. Rapid Detection and Quantitation of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus in Experimentally Challenged Rainbow Trout by Realtime RT-PCR, J. Virol Methods, 132,154-159.
- Ciolac, A., 2004. Migration of Fishes in Romanian Danube River, Applied Ecology and Environmental Research, 2 (1), 143-163.
- Coad, B., 1997. Shad in Iranian Waters, Shad Journal, 2(4), 4-8.
- Coad, B., W., Hussain, N., A., Ali, T., S. ve Limburg, K., E., 2003. Middle Eastern Shads, In: Biodiversity, Status and Conservation of The World's Shads (Eds., Limburg, K., E. and Waldman, J., R.), American Fisheries Society Symposium 35, Maryland, 59-67 s.
- Corkum, L., D., Sapota, M., R., Skóra, K., E., 2004. The Round Goby, *Neogobius melanostomus*, a Fish Invader on Both Sides of The Atlantic Ocean, Biol. Invasions, 6, 173–181.
- de Kinkelin, P. ve Scherrer, R., 1970. Le Virus d'Egtved I. Stabilite, Development et Structure du Virus de la Souche Danoise F1, Annual Research Veterinary, 1, 17–30.
- de Kinkelin, P., Bearzotti-Le, B., M. ve Bernard, J., 1980. Viral Hemorrhagic Septisemia of Rainbow Trout Selection of A Thermoresistant Virus Variant and Comparison of Polypeptide Synthesis with The Wild-Type Virus Strain, Journal of Virology, 36, 652–658.
- de Kinkelin, P. ve Castric, J., 1982. An Experimental Study of The Susceptibility of Atlantic Salmon Fry (*Salmo salar*) to Viral Hemorrhagic Septicemia, Journal of Fish Diseases, 5, 57–65.
- de Kinkelin, P., 1983. Antigens of Fish Pathogens, Viral Haemorrhagic Septicaemia, in D.P. Anderson, M. Dorson, and P. Dubourget, eds., Pages 5162, Fondation Marcel Merieux, Lyon, France.
- de las Heras, A., I., Saint-Jean, S., R. and Perez-Prieto, S., I., 2008. Salmonid Fish Viruses and Cell Interactions at Early Steps of The Infective Cycle, Journal of Fish Diseases, 31(7), 535-546.
- Dixon, P., F., Feist, S., Kehoe, E., Parry, L., Stone, D., M. ve Way, K., 1997. Isolation of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus From Atlantic Herring *Clupea harengus* from The English Channel, Diseases of Aquatic Organisms, 30, 81-89.
- Dixon, P., F., Avery, S., Chambers, E., Feist, S., Mandhar, H., Parry, L., Stone, D., M., Strømmen, H., K., Thurlow, J., K., Tsin-yei Lui, C. ve Way, K., 2003. Four Years of Monitoring for Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus in Marine Waters Around The United Kingdom, Diseases of Aquatic Organisms, 54, 175-186.

- Dougherty, R., M., 1964. Animal Virus Titration Techniques, In R. J. C. Harris (ed.), *Techniques in Experimental Biology*, 183-186, Academic Press, New York.
- E.C. (96/240/EC), 1996. Commission Decision of 5 February 1996 Amending Decision 92/532/EEC Laying Down The Sampling Plans and Diagnostic Methods for The Detection and Confirmation of Certain Fish Diseases, Off J Eur Comm No. L 79/19-28
- E.C. (2001/183/EC), 2001. Sampling Plans and Diagnostic Methods for The Detection and Confirmation of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) and Infectious Pancreatic Necrosis (IPN), European Communities, 2001/183, European Commission.
- Einer-Jensen, K., Ahrens, P., Forsberg, R. ve Lorenzen, N., 2004. Evolution of The Fish Rhabdovirus Viral Haemorrhagic Septicemia Virus, Journal of General Virology, 85, 1167-1179.
- Einer-Jensen, K., Winton, J. ve Lorenzen, N., 2005. Genotyping of The Fish Rhabdovirus, Viral Haemorrhagic Septicemia Virus, by Restriction Fragment Length Polymorphisms, Veterinary Microbiology, 106, 167-178.
- Elsayed, E., Fiasal, M., Thomas, M., Whelan, G., Batts, W. ve Winton, J., 2006. Isolation of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus from Muskellunge, *Esox masquinongy* (Mitchill), in Lake St. Clair, Michigan, USA Reveals A New Sublineage of The North American Genotype, Journal of Fish Diseases, 29, 611-619.
- Elmen, J., M., Freeman, D., C., Mills, A., Graham, J., H., 1998. How Organisms Do The Right Thing: The Attractor Hypothesis, Chaos, 8, 717-726.
- Emre, Y. ve Kürüm, V., 1998. Havuz ve Kafeslerde Alabalık Yetiştiriciliği Teknikleri, Minpa Yayınevi, Ankara.
- Eryılmaz, L., S., 2001. A Study on The Bony Fishes Caught in The South of The Sea of Marmara by Bottom Trawling and Their Morphologies, Turkish Journal of Zoology, 25, 323-342.
- Faisal, M. ve Ahne, W., 1980. Use of The Immunoperoxidase Technique for Detection of Fish Virus Antigens, 186-192, Springer-Verlag, Berlin.
- Faisal, M. ve Schulz, C.A., 2009. Detection of Viral Haemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) from The Leech *Myzobdella lugubris* Leidy, 1851, Parasites and Vectors, 2, 45.
- Faisal, M. ve Winters, A., D., 2011. Detection of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) from *Diporeia spp.* (Pontoporeiidae, Amphipoda) in the Laurentian Great Lakes, USA, Parasites and Vectors, 4, 2.
- Faisal, M., Shavalier, M., Kim, K., R., Millard, E., V., Gunn, M., R., Winters, A., D., Schulz, C., A., Eissa, A., Thomas, M., V., Wolgamood, M., Whelan, G., E.,

- Winton, J., 2012. Spread of The Emerging Viral Hemorrhagic Septicemia Virus Strain, Genotype IVb, in Michigan, USA, Viruses, 4, 734-760.
- Follett, J., E., Meyers, T., R., Burton, T., O., Geesin, J., L., 1997. Comparative Susceptibilities of Salmonid Species in Alaska to Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) and North American Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV), J. of Aquatic Animal Health, 9, 34-40.
- F.R.S., 2006. Risks to Wild Freshwater Fisheries from Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) Disease, Fisheries Research Services.
- Francis-Floyd, R., 1990b. Stress: Its Role in Fish Disease, CIR919, University of Florida, IFAS Series.
- Frerichs, G., N., Morgan, D., Hart, D., Skerrow, C., Roberts, R., J. ve Onions, D., E., 1991. Spontaneously Productive C-Type Retrovirus Infection of Fish Cell Lines, Journal of General Virology, 72, 2537-2539.
- Gadd, T., 2013. Fish Rhabdoviruses; Viral Haemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) and Perch Rhabdovirus (PRV): Study of Viral Strains and The Disease Epidemiology in Finland, PhD Thesis, University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Finland.
- Garver, K., A., Traxler, G., S., Hawley, L., M., Richard, J., Ross, J., P. ve Lovy, J., 2013. Molecular Epidemiology of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) in British Columbia, Canada, Reveals Transmission from Wild to Farmed Fish, Diseases of Aquatic Organisms, 104, 93-104.
- Geldiay, R. ve Balık, S., 1996. Türkiye Tatlı Su Balıkları, Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir.
- Ghittino, P., 1965. Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) in Rainbow Trout in Italy, Annual N. Y. Academic Sciences, 126, 468-478.
- Goodwin, E., A., Peterson, E., J., Meyers, R. ve Money, J., D., 2004. Transmission of Exotic Fish Viruses: The Relative Risks of Wild and Cultured Bait, American Fisheries Society- Fisheries, 29 (5), 19-23.
- Goodwin, E., A. ve Merry, G., E., 2011. Mortality and Carrier Status of Bluegills Exposed to Viral Hemorrhagic Septicemia Virus Genotype IVb at Different Temperatures, Journal of Aquatic Animal Health, 23 (2), 85-91.
- Gravell, M. ve Malsberger, R., G., 1965. A Permanent Cell Line from The Fathead Minnow (*Pimephales promelas*), Annual N. Y. Academic Sciences, 126, 555-565.
- Groocock, G., H., Getchell, R., G., Wooster, G., A., Britt, K., L., Batts, W., N., Winton, J., R., Casey, R., N., Casey, J., W. ve Bowser, P., R., 2007. Detection of Viral Hemorrhagic Septicemia in Round Gobies in New York State (USA) Waters of

- Lake Ontario And The St. Lawrence River, Diseases of Aquatic Organisms, 76, 187-192.
- Hauck, W., W., 1991. Confidence Intervals for Seroprevalence Determined From Pooled Sera, Ann. Epidemiol. 1, 277–281.
- Hedrick, R., P., Batts, W., N., Yun, S., Traxler, G., S., Kaufman, J. ve Winton, J., R., 2003. Host and Geographic Range Extensions of The North American Strain of Viral Haemorrhagic Septicemia Virus Host, Diseases of Aquatic Organisms, 55, 211-220.
- Hernaman, V., Munday, P., L. ve Schläppy, M., L., 2000. Validation of Otolith Growth-Increment Periodicity in Tropical Gobies, Marine Biology, 137 (4), 715-726.
- Hill, B., 1992. Impact of Viral Diseases on Salmonid Fish in Europe, In: Proceedings of the OJI International Symposium on Salmonid Diseases, by T. Kimura, Ed., Hokkaido University Press, Sapporo, Japan.
- Hershberger, P., K., Kocan, R., M., Elder, N., E., Meyers, T., R. ve Winton, J., R., 1999. Epizootiology of Viral Hemorrhagic Septisemia Virus in Pacific Herring from The Spawn-On-Kelp Fishery in Prince William Sound, Alaska, USA, Diseases of Aquatic Organisms, 37, 23–31.
- Hopper, K., 1989. The Isolation of VHSV from Chinook Salmon at Glenwood Springs, Orcas Island, Washington, Fish. Soc. Fish Health Sec. Newsettler, 17, 1-2.
- I.C.T.V., 2000. Introduction Virus Taxonomy Online: Seventh Report of The International Committee on Taxonomy of Viruses, The Virus Species Concept.
- Isshiki, T., Nishizawa, T., Kobayashi, T., Nagano, T. ve Miyazaki, T., 2001. An Outbreak of VHSV (Viral Hemorrhagic Septicemia Virus) Infection in Farmed Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan, Dis. of Aquat. Org., 47, 87–99.
- Işıdan, H., 2010. Karadeniz Bölgesindeki Balıklarda Viral Hemorajik Septisemi Virüsünün İzolasyonu ve Patojenitelerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Işıdan, H. ve Bolat, Y., 2011. A Survey of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) in Turkey, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 11, 507-513.
- Ivanov, L., Beverton, R., J., H., 1985: The Fish Resources of The Mediterranean, Part two: Black Sea. Etud. Rev. CGPM/Stud. Rev. GFCM.
- Jensen, M., H., 1963. Preparation of Fish Tissue Cultures for Virus Research, Bulletin de L'Office International des Epizooties, 59, 131–134.
- Jensen, N., J., Bloch, B. ve Larsen, J., L., 1979. The Ulcus-Syndrome in Cod (*Gadus morhua*) III, A Preliminary Virological Report, Nordisk Veterinarmedicin, 34, 136–142.

- Johansen, L., H., Jensen, I., Mikkelsen, H., Bjørn, P., A., Jansen, P., A. ve Bergh, Ø., 2011. Disease Interaction and Pathogens Exchange Between Wild and Farmed Fish Populations with Special Reference to Norway, Aquaculture, 315, 167-186.
- Jones, J., B., Hyatt, A., D., Hine, P., M., Whittington, R., J., Griffin, D., A., Bax, N., J., 1997. Special Topic Review: Australasian Pilchard Mortalities, World J. Microbiol. Biotechnol., 13, 383–392.
- Jørgensen, P., E., V., 1974. A Study of Viral Diseases in Danish Rainbow Trout, Their Diagnosis and Control, PhD Thesis, Danish Royal Vet. and Agri. Univ., Copenhagen.
- Jørgensen, P., E., V., 1980. Egtved Virus: The Susceptibility of Brown Trout and Rainbow Trout to Eight Virus Isolates and The Significance of The Findings for The VHS Control, in W. Ahne, ed. Fish Diseases, Springer Verlag, Berlin, 37 s.
- Jørgensen, P., E., V. ve Olesen, N., J., 1987. Cod Ulcus Syndrom Rhabdovirus is Indistinguishable from The Egtved (VHS) Virus, Bulletin of The European Association of Fish Pathologists, 7, 73–74.
- Jørgensen, P., E., V., 1992. Recent Advances in Surveillance and Control of Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) of Trout. In: Proceedings of The OJI International Symposium on Salmonid Diseases (ed. by T. Kimura), 60–71 s, Hokkaido University Press, Sapporo, Japan.
- Jude, D., J. ve DeBoe, S., F., 1996. Possible Impacts of Gobies and Other Introduced Species on Habitat Restoration Efforts, Can. J. of Fisheries and Aq. Sci., 53, 136-141.
- Jude, D., J., Reider, R., H. ve Smith, G., R., 1992. Establishment of *Gobiidae* in The Great Lakes Basin, Can. J. of Fisheries and Aq. Sci., 49, 416-421.
- Kahns, S., Skall, H., F., Kaas, R., S., Korsholm, H., Jensen, B., B., Jonstrup, S., P., Dodge, M., J., Einer-Jensen, K., Stone, D. ve Olesen, N., J., 2012. European Freshwater VHSV Genotype Ia Isolates Divide into Two Distinct Subpopulations, Diseases of Aquatic Organisms, 99, 23-35.
- Kalaycı, G., İncöğlü, S. ve Özkan, B., 2006. First Isolation of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) Virus from Turbot (*Scophthalmus maximus*) Cultured in The Trabzon Coastal Area of The Black Sea in Turkey, B. Eur. Ass. Fish Path., 26 (4), 157-162.
- Kalaycı, G., İncöğlü, Ş., Özyer B., Ö. ve Küçükali, Y., 2012. Türkiye’de İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis ve Viral Hemorajik Septisemi Hastalıklarının Durumu, Bornova Vet. Bil. Derg., 34 (48), 31-38.
- Kang, M., S., Oh, M., J., Kim, Y., J., Kawai, K. ve Jung, S., J., 2003. Establishment and Characterization of Two New Cell Lines Derived From Flounder, *Paralichthys olivaceus*, Temmicks ve Schlegel, Journal of Fish Diseases, 26: 657-665.

- Kazancheev, E., N., 1981. Fishes of The Caspian Sea: A Key, Moscow, 168 s.
- Kehlet, N., P., 1973. A Summary of The Rules, Methods and Results of The Danish Campaign Against Infectious Disease of Freshwater Fish, EIFAC (Eur. Inland Fish. Advis. Comm.) Tech. Pap. 17, Suppl. 2, 37-38 s.
- Kim, W., S., Kim, S., R., Kim, D., Kim, J., O., Park, M., A., Kitamura, S., I., Kim, H., Y., Kim, D., H., Han, H., J., Jung, S., J. ve Oh, M., J., 2009. An Outbreak of VHSV (Viral Hemorrhagic Septicemia Virus) Infection in Farmed Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* In Korea, Aquaculture, 296, 165–168.
- King, J., A., Snow, M., Skall, H., F. ve Raynard, R., S., 2001a. Experimental Susceptibility of Atlantic Salmon *Salmo salar* and Turbot *Scophthalmus maximus* to European Freshwater and Marine Isolates of Viral Haemorrhagic Septicemia Virus, Diseases of Aquatic Organisms, 47 (1), 25-31.
- King, J., A., Snow, M. ve Raynard, R., S., 2001b. Distribution Of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus in Wild Fish Species of The North Sea, North East Atlantic Ocean and Irish Sea, Diseases of Aquatic Organisms, 47; 81–86.
- Kline, R., L., Brothers, T., A., Brookmeyer, R., Zeger, S. ve Quicc, T., C., 1989. Evaluation of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Seroprevalence in Population Surveys Using Pooled Sera, Journal of Clinic Microbiology, 27; 1449–1452.
- Knuesel, R., Segner, H. ve Wahli, T., 2003. A Survey of Viral Diseases in Farmed and Feral Salmonids in Switzerland, J. Fish Diseases, 26, 167–182.
- Kocan, R., M., Hershberger, P., K. ve Elder, N., E., 2001. Survival of The North American Strain of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) in Filtered Seawater and Seawater Containing Ovarian Fluid, Crude Oil And Serum-Enriched Culture Medium, Diseases of Aquatic Organisms, 44, 75-78.
- Kolarov, P., 1965. On The Biological Characteristics of *Alosa kessleri pontica* Eichw. in The Bulgarian Sector of Danube River, In: Proc. RIFO, Varna, 87–97.
- Kottelat, M. ve Freyhof, J., 2007. Handbook of European freshwater fishes, Publications Kottelat, Cornol, Switzerland. 646 s.
- Kurth, J., Waldmaan, R., Heith, J., Mausebach, K. ve Burian, R., 1999. Efficient Inactivation of Viruses and Mycoplasma in Animal Sera Using UVC Irridation, Dev. Biol. Stand., 99, 111–118.
- Kuru, M., 2004. Recent Systematic Status of Inland Water Fishes of Turkey, Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi, 24 (3), 1–21.
- Kusuda, R. ve Kawarasaki, A., 1993. Establishment and Charaterization of A Cell Line Derived from The Kidney of Red Sea Bream, *Pagrus major*, Suisanzoshoku, 41, 455–460.

- Lannan, C., N., Winton, J., R. ve Fryer, J., R., 1984. Fish Cell Lines: Establishment and Characterization of Nine Cell Lines from Salmonids, In Vitro, 20, 671–676.
- Last, J., M., 1988. A dictionary of Epidemiology, 2nd edition, Oxford University Press, Oxford.
- Lorenzen, E., Carstensen, B. ve Olesen, N., J., 1999. Inter-Laboratory Comparison of Cell Lines for Susceptibility to Three Viruses: VHSV, IHNV and IPNV, Diseases of Aquatic Organisms, 37, 81-88.
- Lumsden, J., S., Morrison, B., Yason, C., Russell, S., Young, K., Yazdanpanah, A., Huber, P., Al-Hussiney, L., Stone, D., Way, K., 2007 Mortality Event in Freshwater Drum *Aplodinotus grunniens* from Lake Ontario, Canada, Associated with Viral Haemorrhagic Septicemia Virus, Type IV, Diseases of Aquatic Organisms, 76, 99-111.
- Mazeaud, M., M., Mazeaud, F., Donaldson, E., M., 1977. Primary and Secondary Effects of Stress in Fish: Some New Data with A General Review, Trans. Am. Fish Soc., 106, 201–212.
- McAllister, P., E., 1979. Fish Viruses and Viral Infections, Comph. Virology, 14, 401–470.
- McAllister, P., E. ve Schill, W., B., 1986. Immunoblot Assay: A Rapid and Sensitive Method for Identification of Salmonid Fish Viruses, Journal of Wildl. Diseases, 22, 468–474.
- McAllister, P., E., 1990. Fish Disease Leaflet 83: Viral Hemorrhagic Septisemia of Fishes, US Fish and Wildlife Service, Kesrneysville, West Virginia.
- M.E.G.E.B., 2008. Denizcilik, Populasyon Dinamiği, Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, T. C. Milli Eğitim Bakanlığı, Ankara.
- Meier, W. ve Jørgensen, P., E., V., 1975. A Rapid and Specific Method for The Diagnosis of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) of Rainbow Trout, Riv. Ital. Piscic. Ittiop., 10, 11–15.
- Meyers, T., R., Short, S., Lipson, K., Batts, W., N., Winton, J., R., Wilcock, J., Brown, E., 1994. Association of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus with Epizootic Haemorrhages of The Skin in Pacific Herring *Clupea harengus* Pallas from Prince William Sound and Kodiak Island, Alaska, USA, Diseases of Aquatic Organisms, 19, 27–37.
- Meyers, T., R. ve Winton, J., R., 1995. Viral Hemorrhagic Septicemia Virus in North America, Annu. Rev. Fish Dis., 53-24.
- Meyers, T., R., Short, S. ve Lipson, K., 1999. Isolation of The North American Strain of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) Associated With Epizootic Mortality in Two New Host Species of Alaskan Marine Fish, Diseases of Aquatic Organisms, 38, 81-86.

- Miller, P., J., 1986. Gobiidae, (In Whitehead, P., J., P., Bauchot, M., L., Hureau, J., C., Nielsen, J., Tortonese, E., Eds, Fishes of the Northeastern Atlantic and The Mediterranean), Vol 3, UNESCO, Paris, 1019-1085.
- Mortensen, H., F., Heuer, O., E., Lorenzen, N., Otte, L. ve Olesen, N., J., 1999. Isolation of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus from Wild Marine Fish Species in The Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak, and The North Sea, Virus Research, 63, 95–106.
- Moskal'kova, K., I., 1996. Ecological and Morphophysiological Prerequisites to Range Extention in The Round Goby *Neogobius melanostomus* Under Conditions of Anthropogenic Pollution, Journal of Ichthyology, 36, 584-590.
- Nicholson, B., L. ve Byrne, C., 1973. An Established Cell Line From The Atlantic Salmon (*Salmo Salar*), J. Fish Res. Board. Can., 30, 913-916.
- Nishizawa, T., Iida, H., Takano, R., Isshiki, T., Nakajima, K. ve Muroga, K., 2002. Genetic Relatedness Among Japanese, American and European Isolates of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) Based on Partial G and P Genes, Disease of Aquatic Organisms, 48, 143-148.
- Nishizawa, T., Savaş, H., Işıdan, H., Üstündağ, C., Iwamoto, H. ve Yoshimizu, M., 2006. Genotyping and Pathogenicity of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus from Free-Living Turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish Coastal Area of the Black Sea, Appl. Environ. Microbiol., 72, 2373-2378.
- Navodaru, I. ve Waldman, J., R., 2003. Shads of Eastern Europe From the Black Sea: Review of Species and Fisheries. In: Biodiversity, Status and Conservation of The World's Shads (Eds., Limburg, K., E. and Waldman, J., R.), American Fisheries Society Symposium 35, Maryland, 69-76 s.
- N.W.F.H.S., 2001. Laboratory Procedures Manual-Version 1.0, Chapter 11 Virology, Ray Brunson, National Wild Fish Health Survey.
- O.İ.E., 2006. Manual and Diagnostic Tests for Aquatic Animals, Chapter 2.1.5. Viral Hemorrhagic Septicemia, World Organisation for Animal Health.
- O.İ.E., 2010. Manual and Diagnostic Tests for Aquatic Animals, Chapter 2.3.9. Viral Hemorrhagic Septicemia, World Organisation for Animal Health.
- O.İ.E., 2012. Manual and Diagnostic Tests for Aquatic Animals, Chapter 2.3.9. Viral Hemorrhagic Septicemia, World Organisation for Animal Health.
- Olesen, N., J. ve Jørgensen, P., E., V., 1992. Comparative Susceptibility of Three Fish Cell Lines To Egtved Virus, The Virus of Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS), Diseases of Aquatic Organisms, 12, 235–237.
- Öğüt, H., 2005. Balıklarda Stres, Balık Biyolojisi Araştırma Yöntemleri, (Editör: M., Karataş), Nobel Yayıncılık, 498s.

- Özuluğ, M., 1999. A Taxonomic Study on The Fish in The Basin of Büyükçekmece Dam Lake, Tr. J. of Zoology, 23, 439-451.
- Özuluğ, M., Tarkan, A., S., Gaygusuz, Ö. ve Gürsoy, Ç., 2007. Two New Records for The Fish Fauna of Lake Sapanca Basin (Sakarya, Turkey), J. of Fisheries Sciences, 1 (3), 152-159.
- Parry, L. ve Dixon, P., F., 1997. Stability of Nine Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) Isolates in Sea Water, Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 17, 31-36.
- Peters, F. ve Neukirch, M., 1986. Transmission of Some Fish Pathogenic Viruses by The Heron, *Ardea cinerea*, Journal of Fish Diseases, 9, 539-544.
- Pickering, A., D., 1981. Stress and Fish, Academic Press, London.
- Polat, H. ve Ergün, H., 2008. Karadeniz'in Pelajik Balıkları, SÜMAE Yunus Araştırma Bülteni, 8, 1-5.
- Quillet, E., Dorson, M., Aubard, G., Torhy, C., 2001. In Vitro Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus Replication in Excised Fins of Rainbow Trout: Correlation with Resistance to Waterborne Challenge and Genetic Variation, Diseases of Aquatic Organisms, 45,171-182.
- Quillet, E., Dorson, M., Le Guillou, S., Benmansour, A., Boudinot, P., 2007. Wide Range of Susceptibility to Rhabdoviruses in Homozygous Clones of Rainbow Trout, Fish Shellfish Immunol., 22, 510-519.
- Rasmussen, C., J., 1965. A Biological Study of The Egtved Disease (INUL), Annals of The New York Academy of Sciences, 126, 427-460.
- Raynard, R., Thomas, W., Vatsos, I. ve Mortensen, S., 2007. Review of disease interactions and pathogen exchange between farmed and wild finfish and shellfish in Europe, 459 s, Oslo, Norway.
- Reid, S., G., Bernier, N., J., ve Perry, S., F., 1998. The Adrenergic Stress Response in Fish: Control of Catecholamine Storage and Release, Comparative Biochemistry and Physiology, 120, 1-27.
- Reshetnikov, S., I., Pashkov, A., N. ve Bondarev, B., K., 2006. A New Case of Catching The European Pilchard *Sardina Pilchardus* (*Clupeidae*, *Clupeiformes*) in The Northeastern Part of The Black Sea, Journal of Ichthyology, 46, 803-805.
- Rodman, G., G., Cornwell, E., R., Grocock, G., H., Wong, P., T., Coffee, L., L., Wooster, G., A. ve Bowser, P., R., 2013. Experimental Transmission of VHSV Genotype IVb by Predation, J. of Aqu. Ani. Health, 25 (4), 221-229.
- Schäperclaus, W., 1938. Die Schädigungen der Deutschen Fischerei Durch Fischparasiten und Fischkrankheiten, Fischerei Zeitung, 22, 1938, 1-20.

- Schäperclaus, W., 1954. Undersogelse af Sygdom hos Orredernei Danske orreddambrug og Forslag til Bakampelse Heraf, Ferskvandsfiskeribladet, 52, 145–149.
- Schreck, C., B., 2000. Accumulation and Long-Term Effects of Stress in Fish, In: Moberg, G. P., Mench, J. A. (Eds.), *The biology of animal stres*, CAB International, Wallingford, 147–158.
- Schutze, H., Mundt, E. ve Mettenleiter, T., C., 1999. Complete Genomic Sequence of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus, a Fish Rhabdovirus, Virus Genes, 19, 59–65.
- Selye, H., 1950. Stress and The General Adaptation Syndrome, British Medical Journal, 1, 1383–1392.
- Selye, H., 1973. The Evolution of The Stress Concept, American Scientist, 61, 692–699.
- Skall, H., F., Slierendrecht, W., J., King, A., J. ve Olesen, N., J., 2004a. Experimental Infection of Rainbow Trout (*Onchornychuss mykiss*) with Viral Haemorrhagic Septicemia Virus Isolates from European Marine and Farmed Fishes, Disease of Aquatic Organisms, 58, 99-110.
- Skall, H., F., Kjær, T., E. ve Olesen, N., J., 2004b. Investigation of Wild Caught Whitefish, *Coregonus lavaretus* (L.), for Infection With Viral Haemorrhagic Septicemia Virüs (VHSV) and Experimental Challenge of Whitefish With VHSV, Journal of Fish Diseases, 27, 401-408.
- Skall, H., F., Olesen, N., J. ve Møllergaard, S., 2005a. Prevalence of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus in Danish Marine Fishes and Its Occurrence in New Host Species, Disease of Aquatic Organisms, 66, 145-155.
- Skall, H., F., Olesen, N., J. ve Møllergaard, S., 2005b. Viral Hemorrhagic Septicemia Virus in Marine Fish and Its Implications for Fish Farming- A Review, Journal of Fish Diseases, 28, , 509–529.
- Skora, K., E. ve Stolarski, J., 1993. New Fish Species in The Gulf of Gdansk, *Neogobius sp.* (cf. *Neogobius melanostomus* (Pallas 1811)), Notes Bulletin Sea Fisheries Institute 1, 83 s.
- Slastenenko, E., 1956. Karadeniz Havzası Balıkları [Fishes of Black Sea Basin], Et ve Balık Kurumu Yayınları, İstanbul.
- Smail, D., A., 1995. Isolation and Identification of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) Virus from North Sea Cod (*Gadus morhua*, L.), ICES Maricult. Comm. CM 1995/F:15.
- Smail, D., 1999. Viral Haemorrhagic Septicaemia, In: Woo, P., T., K., Bruno, D., W., (Eds) *Fish Diseases and Disorders*, Vol 3. CABI Publishing, New York, 123–147.
- Smail, D., A., 2000. Isolation and Identification of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) Viruses from Cod (*Gadus morhua*) with The Ulcus Syndrome and from Haddock

- (*Melenogrammus aeglefinus*) Having Skin Hemorrhages in The North Sea, Diseases of Aquatic Organisms, 41, 231–235.
- Smirnov, Y., A., Kapitulets, S., P., Amitina, N., N., Gheuskaya, V., A. ve Kaverin, N., V., 1991. Effect of UV Irridation on Rotavirus, Acta. Virol., 35, 1–6.
- Snow, M., Cunninham, C., O., Melvin, W., T. ve Kurath, G., 1999. Analyses of The Nucleoprotein Gene Identifies Dinstinct Lineages of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus within The European Marine Environment, Virus Research, 63, 35–44.
- Snow, M. ve Smail, D., A., 1999. Experimental Susceptibility of Turbot *Scophthalmus maximus* to Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus Isolated from Cultivated Turbot, Diseases of Aquatic Organisms, 38, 163-168.
- Snow, M., King, J., A., Garden, A. ve Raynard, R., S., 2005. Experimental susceptibility of Atlantic cod, *Gadus morhua* (L.), and Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), to Different Genotypes of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus, Journal of Fish Diseases, 28, 737-742.
- Sommerset, I., Krossoy, B., Biering, E. ve Frost, P., 2005. Vaccines for Fish in Aquaculture, Expert Review of Vaccines, 4, 89-101.
- Stoyanov, S., Georgiev, J., Ivanov, L., Hristov, D., Kolarov, P., Aleksandrova, K. ve Karapetkova, M., 1963. Fishes in The Black Sea (Bulgarian Coast). Governmental Publ. House, Varna, 246 s.
- Takano, R., Nishizawa, M., Arimoto, M. ve Muroga, K., 2000. Isolation of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) from Wild Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 20 (5), 186-192.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. ve Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods, Molecular Biology and Evolution, 28, 2731-2739.
- Tomasec, J. ve Fijan, N., 1971. Virusne Bolestriba (Viral Diseases of Fish), Final Report on Research under A Part of Project, Zagreb.
- Traxler, G., S., Kieser, D. ve Evelyn, T., P., T., 1995. Isolation of North American Strain of VHS Virus from Farmed Atlantic salmon, Aquaculture, 72, 1–2.
- Turan, C., Öztürk, B., Ergüden, D., Gürlek, M., Yağlıoğlu, D. ve Uygur, N., 2007. Atlas of Bony Fishes of Turkey. In: Atlas and Systematics of Marine Bony Fishes of Turkey (Ed. Turan, C.), Nobel Kitabevi, Adana, 83-485.
- T.Ü.İ.K., 2012. Su Ürünleri İstatistikleri, Türkiye İstatistik Kurumu, Ankara.

- Way, K. ve Dixon, P., E., 1988. Rapid Detection of VHS and IHN Viruses by The Enzymlinked Immunosorbent Assay (ELISA), Journal of Applied Ichthyology, 4, 182–189.
- Wendelaar-Bonga, S., E., 1997. The Stres Response in Fish, Physiological Reviews, 77, 591-625.
- Whitehead, P., J., P., 1984a. Clupeidae, In: Fishes of The North-Eastern Atlantic and The Mediterranean, Vol. 1, 268-281 s, UNESCO.
- Whitehead, P., J., P., 1985. FAO Species Catalogue, Vol. 7. Clupeoid Fishes of The World (suborder *Clupeoidei*), An Annotated and Illustrated Catalogue of The Herrings, Sardines, Pilchards, Sprats, Shads, Anchovies and Wolf-Herrings, FAO Fish. Synop., 125 (7/1), 1-303, Rome.
- Winton, J., R., Batts, W., N., Deering, R., E., Brunson, R., Hopper, K., Nishizawa, T. ve Stehr, C., 1991. Characteristics of The First North American Isolates of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus, In: Proceedings of The Second International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates (ed. by J.L. Fryer), 43–50 s, Oregon State University Press, Corvallis.
- Wolf, K. ve Quimby, M., C., 1962. Established Eurythermic Lines of Fish Cells in Vitro, Science, 135, 1065–1066.
- Wolf, K. ve Quimby, M., C., 1973. Fish Viruses Buffers and Methods for Plaquing Eight Agents Under Normal Atmosphere, Applied Microbiology, 25, 659–664.
- Wolf, K., Gravell, M. ve Merlsberger, R., G., 1966. Lymphocystis Virus: Isolation and Propagation in Centrarchid Fish Cell Lines, Science, 151, 1004–1005
- Wolf, K., 1988. Viral Hemorrhagic Septicemia, Fish Viruses and Fish Viral Diseases, 217–249, Cornell University Press, New York,.
- Yasutake, W., T., 1970. Comparative Histopathology of Epizootic Salmonid Virus Diseases, A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes, American Fisheries Society, 5, 341–350.
- Zwillenberg, L., O., Jensen, M., H. ve Zwillenberg, H., H., L., 1965. Electron Microscopy of The Virus of Viral Hemorrhagic Septicemia of Rainbow Trout (Egtved Virus), Archives of Virology, 17 (1), 1–19.

8. EKLER

Ek Tablo 1. VHSV'ne duyarlı balık türleri (O.İ.E., 2012)

Familya	Balık Türü	Latince Adı
Ammodytidae	Pacific sand lance	<i>Ammodytes hexapterus</i>
	Sand eel	<i>Ammodytes spp.</i>
	Pacific sand eel	<i>Ammodytes personatus</i>
Anoplopomatidae	Sablefish	<i>Anoplopoma fimbria</i>
Anguillidae	European eel	<i>Anguilla anguilla</i>
	American eel	<i>Anguilla rostrata</i>
Argentinidae	Lesser argentine	<i>Argentina sphyraena</i>
Aulorhynchidae	Tube-snout	<i>Aulorhynchus flavidus</i>
Carangidae	Japanese amberjack	<i>Seriola quinqueradiata</i>
Catostomidae	Silver redhorse	<i>Moxostoma anisurum</i>
	Shorthead redhorse	<i>Moxostoma macrolepidotum</i>
Centrarchidae	Largemouth bass	<i>Micropterus salmoides</i>
	Largemouth bass	<i>Micropterus salmoides</i>
	Smallmouth bass	<i>Micropterus dolomieu</i>
	Bluegill	<i>Lepomis macrochirus</i>
	Pumpkinseed	<i>Lepomis gibbosus</i>
	Black crappie	<i>Pomoxis nigromaculatus</i>
	Rock bass	<i>Ambloplites rupestris</i>
Clupeidae	Atlantic herring	<i>Clupea harengus</i>
	Pacific herring	<i>Clupea pallasii</i>
	South American pilchard	<i>Sardinops sagax</i>
	European sprat	<i>Sprattus sprattus</i>
	American gizzard shad	<i>Dorosoma cepedianum</i>
Cyprinidae	Fathead minnow	<i>Pimephales promelas</i>
	Ebro barbel	<i>Barbus graellsii</i>
	Bluntnose minnow	<i>Pimephales notatus</i>
	Emerald shiner	<i>Notropis atherinoides</i>
	Spottail shiner	<i>Notropis hudsonius</i>
	Iberian nase	<i>Chondrostoma polylepis</i>
	Zebra danio	<i>Danio rerio</i>
	Goldfish	<i>Carassius auratus</i>
Embiotocidae	Shiner perch	<i>Cymatogaster aggregata</i>
Esocidae	Muskellunge	<i>Esox masquinongy</i>
	Northern pike	<i>Esox lucius</i>
Fundulidae	Mummichog	<i>Fundulus heteroclitus</i>
Gadidae	Atlantic cod	<i>Gadus morhua</i>
	Poor cod	<i>Trisopterus minutus</i>
	Whiting	<i>Merlangius merlangus</i>
	Blue whiting	<i>Micromesistius poutassou</i>
	Norway pout	<i>Trisopterus esmarkii</i>
	Alaska pollock	<i>Theragra chalcogramma</i>
	Pacific cod	<i>Gadus macrocephalus</i>
	Haddock	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>
	Pacific tomcod	<i>Microgadus proximus</i>
Gasterosteidae	Three-spined stickleback	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
Gobiidae	Sand goby	<i>Pomatoschistus minutus</i>
	Round goby	<i>Neogobius melanostomus</i>
Ictaluridae	Brown bullhead	<i>Ictalurus nebulosus</i>
	Channel catfish	<i>Ictalurus punctatus</i>
Liparidae	Cubed snailfish	<i>Liparis tessellatus</i>
Lotidae	Fourbeard rockling	<i>Enchelyopus cimbrius</i>
	Burbot	<i>Lota lota</i>

Ek Tablo 1'in devamı...

Familya	Balık Türü	Latince Adı
Merlucciidae	(North) Pacific hake	<i>Merluccius productus</i>
Moronidae	European seabass	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	White bass	<i>Morone chrysops</i>
	Striped bass	<i>Morone saxatilis</i>
	White perch	<i>Morone americana</i>
	Black porgy	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>
	Red seabream	<i>Pagrus major</i>
Mugilidae	Flathead grey mullet,	<i>Mugil cephalus</i>
Ophidiidae	Armoured cusk	<i>Hoplobrotula armata</i>
Osmeridae (smelts)	Surf smelt	<i>Hypomesus pretiosus</i>
	Eulachon	<i>Thaleichthys pacificus</i>
Paralichthyidae	Japanese flounder	<i>Paralichthys olivaceus</i>
Percidae (perches)	Yellow perch	<i>Perca flavescens</i>
	Walleye	<i>Sander vitreus</i>
	European perch	<i>Perca fluviatilis</i>
Percopsidae	Trout-perch	<i>Percopsis omiscomaycus</i>
Petromyzontidae	European river lamprey	<i>Lampetra fluviatilis</i>
Pleuronectidae	Dab	<i>Limanda limanda</i>
	Flounder	<i>Platichthys flesus</i>
	European plaice	<i>Pleuronectes platessa</i>
	Greenland halibut	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>
	Atlantic halibut	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>
	Marbled flounder	<i>Pleuronectes yokohamae</i>
	English sole	<i>Parophrys vetula</i>
	Blackfin flounder	<i>Glyptocephalus stelleri</i>
Salmonidae	Rainbow trout/Steelhead trout	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
	Chinook salmon	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>
	Coho salmon	<i>Oncorhynchus kisutch</i>
	Atlantic salmon	<i>Salmo salar</i>
	Brown trout	<i>Salmo trutta</i>
	Grayling	<i>Thymallus thymallus</i>
	Whitefish	<i>Coregonus lavaretus</i>
	Whitefish	<i>Coregonus spp.</i>
	Hibrit	<i>O. mykiss</i> × <i>O. kisutch</i>
	Hibrit	<i>O. mykiss</i> × <i>S. fontinalis</i> triploid
	Hibrit	<i>O. mykiss</i> × <i>S. alpinus</i> triploid
	Hibrit	<i>O. mykiss</i> × <i>S. namaycush</i>
	Hibrit	<i>O. mykiss</i> × <i>O. kisutch</i> triploid
	Chum salmon	<i>Oncorhynchus keta</i>
	Sockeye salmon	<i>Oncorhynchus nerka</i>
	Lake trout	<i>Salvelinus namaycush</i>
	Brook trout	<i>Salvelinus fontinalis</i>
	Lake whitefish	<i>Coregonus clupeaformis</i>
	Golden trout	<i>Oncorhynchus aguabonita</i>
	Artic char	<i>Salvelinus alpinus</i>
Splake	<i>S. namaycush</i> × <i>S. fontinalis</i>	
Sciaenidae	Freshwater drum	<i>Aplodinotus grunniens</i>
	Yellow croacker	<i>Larimichthys polyactis</i>
Scophthalmidae	Turbot	<i>Scophthalmus maximus</i>
Scombridae	Chub mackerel, Pacific mackerel	<i>Scomber japonicus</i>
Scorpaenidae	Izu scorpionfish, sting fish	<i>Scorpaena izensis</i>
Scyliorhinidae	Cloudy catshark	<i>Scyliorhinus torozame</i>

Ek Tablo 1'in devamı...

Familya	Balık Türü	Latince Adı
Sebastidae	Black rockfish, Mebaru (Japanese)	<i>Sebastes inermis</i>
	Schlegel's black rockfish	<i>Sebastes schlegelii</i>
Serranidae	Hong Kong grouper	<i>Epinephelus akaara</i>
Soleidae	Senegalese sole	<i>Solea senegalensis</i>
	Senegalese sole	<i>Solea senegalensis</i>
Sparidae	Gilthead seabream	<i>Sparus aurata</i>
	Yellowback seabream	<i>Dentex tumifrons</i>
Stromateidae	Silver pomfret, butter fish	<i>Pampus argentus</i>
Trichiuridae	Largehead hairtail	<i>Trichiurus lepturus</i>
Non-fish	Leech	<i>Myzobdella lugubris</i>
Non-fish	Crustacean	<i>Diporeia</i> spp.

Ek Tablo 2. İstasyonlar, örneklenen balık türleri ve sayıları

İSTASYONLAR						
TÜRLER	Akçaabat	Çamburnu	Çarşıbaşı	Hopa	Yomra	TOPLAM
Barbunya	131	330				461
Çaça		152		100		252
Çinekop	13	16				29
Dikenli vatoz	8	28	34			70
Dil balığı	18	10				28
Gelincik	40	27				67
Kömürcü Kayası	23					23
Kum Kayabalığı		123				123
Hamsi	13	303	70	200		586
İskorpit	21	143				164
İstavrit	417	186		76		679
İzmarit	242	64				306
Kurbağa balığı	11	101	12			124
Kayış balığı	9	5				14
Mezgit (grup)	368	481				849
Mezgit (bireysel)		339			653	992
Sardalya		100				100
Tirsi	85	24				109
Zargana		49				49
TOPLAM	1399	2481	116	376	653	5025

Ek Tablo 3. Doğal balıklarda VHSV taraması (P/G/n; pozitif grup sayısı/grup sayısı/balık sayısı)

	ARALIK			OCAK		ŞUBAT			MART		TOPLAM		
	2009 P/G/n	2010 P/G/n	2011 P/G/n	2009 P/G/n	2010 P/G/n	2011 P/G/n	2009 P/G/n	2010 P/G/n	2011 P/G/n	2009 P/G/n		2010 P/G/n	2011 P/G/n
AKÇAABAT													
Barbunya <i>Mullus barbatus</i>					0/9/43		0/3/13	0/5/24		0/2/8	1/9/43		1/28/131
Lüfer <i>Pomatomus saltatrix</i>					0/1/1	0/1/2	0/3/5			0/1/5			0/6/13
Dikenli Vatoz* <i>Raja clavata</i>													1/8/8*
Dil Balığı <i>Solea sp.</i>					0/2/8	0/1/2	0/1/5	0/1/3					0/5/18
Gelincik <i>Gaidropsarus vulgaris</i>					2/7/32		0/1/5	0/1/3					2/9/40
Hamsi <i>Engraulis encrasicolus</i>					0/1/13								0/1/13
İskorpit <i>Scorpaena porcus</i>					0/4/17					0/1/4			0/5/21
İstavrit <i>Trachurus mediterraneus</i>					0/20/78	0/10/50	2/16/80	0/10/50	1/18/90	0/4/19		0/10/50	3/88/417
İzmarit <i>Spicara smaris</i>					0/13/55		0/4/17	0/21/111		0/1/6	0/10/53		0/49/242
Kayış Balığı <i>Ophidion barbatum</i>					0/1/1	0/1/4	0/1/2	0/1/2					0/4/9
Kurbağa Balığı <i>Uranoscopus scaber</i>					0/2/11								0/2/11
Mezgit (Grup) <i>Merlangius merlangus euxinus</i>				0/13/90			0/35/199			1/16/79			1/64/368
Tirsi <i>Alosa immaculata</i>			0/1/1	1/4/16	0/1/2	0/6/17	0/9/23	1/7/21	0/1/4	0/1/1			2/30/85
Kömürcü Kayası <i>Gobius niger</i>				0/3/4	0/1/5	0/1/6	0/2/3			0/3/5			0/10/23

Ek Tablo 3'ün devamı...

	ARALIK			OCAK		ŞUBAT			MART			TOPLAM	
	2009	2010	2011	2009	2010	2009	2010	2011	2009	2010	2011		
CAMBURNU	P/G/n	P/G/n	P/G/n	P/G/n	P/G/n	P/G/n	P/G/n	P/G/n	P/G/n	P/G/n	P/G/n	P/G/n	
Barbunya <i>Mullus barbatus</i>		1/31/138				0/22/105			0/6/27			1/13/60	2/72/330
Çaça <i>S. sprattus pilchardus</i>		0/5/40				0/16/112							0/21/152
Lüfer <i>Pomatomus saltatrix</i>						0/1/1						0/5/15	0/6/16
Dikenli Vatoz* <i>Raja clavata</i>		0/19/20								0/8/8*			0/27/28
Dil Balığı <i>Solea sp.</i>		0/2/2				0/2/5			0/1/2			0/1/1	0/6/10
Gelincik <i>Gaidropsarus vulgaris</i>		1/8/10				0/11/11			1/2/2			1/4/4	3/25/27
Hamsi <i>Engraulis encrasicolus</i>		0/15/105				0/12/84						0/17/114	0/44/303
İskorpit <i>Scorpaena porcus</i>		0/9/30				1/13/51			0/5/21			0/11/41	1/38/143
İstavrit <i>Trachurus mediterraneus</i>					3/8/46	0/5/17	0/3/16	1/10/10			0/10/10	0/17/81	4/55/186
İzmarit <i>Spicara smaris</i>		0/3/8				0/9/23			0/1/3			0/7/30	0/20/64
Kayış Balığı <i>Ophidion barbatum</i>		0/2/3				0/2/2							0/4/5
Kurbağa Balığı <i>Uranoscopus scaber</i>		5/12/51				5/7/26			0/3/4			0/6/20	10/28/101
Mezgit (Grup) <i>Merlangius merlangus euxinus</i>				0/12/88	0/21/106			2/16/81	1/4/20	0/13/65	6/23/114	0/1/7	9/90/481
Mezgit (Bireysel) <i>Merlangius merlangus euxinus</i>						1/97/97			0/105/105			1/137/137	2/339/339
Sardalya <i>Sardina pilchardus</i>		0/2/6				0/5/8		0/1/1	0/4/12		0/1/2	2/15/71	2/28/100
Tirsi <i>Alosa immaculata</i>		0/2/2				0/7/15			0/1/2			0/2/5	0/12/24

Ek Tablo 3'ün devamı...

<u>ÇAMBURNU</u>	ARALIK			OCAK			ŞUBAT			MART			TOPLAM
	2009	2010	2011	2009	2010	2011	2009	2010	2011	2009	2010	2011	
	P/G/n	P/G/n	P/G/n	P/G/n	P/G/n	P/G/n	P/G/n	P/G/n	P/G/n	P/G/n	P/G/n	P/G/n	P/G/n
Zargana <i>Belone belone</i>		1/10/49											1/10/49
Kum Kaya Balığı <i>Neogobius melanostomus</i>		0/4/11				2/11/49		0/2/6	0/4/21			0/7/36	2/28/123
ÇARSIBASI													
Dikenli Vatoz* <i>Raja clavata</i>													1/34/34*
Hamsi <i>Engraulis encrasicolus</i>						1/10/70							1/10/70
Kurbağa Balığı <i>Uranoscopus scaber</i>						0/3/12							0/3/12
HOPA													
Çaça <i>S. sprattus pilchardus</i>									0/10/100				0/10/100
Hamsi <i>Engraulis encrasicolus</i>					2/10/100			2/10/100					2/20/200
İstavrit <i>Trachurus mediterraneus</i>									0/15/76				0/15/76
PERSEMBE													
İstavrit <i>Trachurus mediterraneus</i>				4/10/70									4/10/70
YOMRA													
Mezgit (Bireysel) <i>Merlangius merlangus euxinus</i>				4/43/43	2/150/150		4/80/80	8/199/199		1/88/88	1/93/93		20/653/653

(*): 2009 yılı Nisan ayında örneklenen dikenli vatoz balıkları

Ek Tablo 4. Alabalıklarda deneysel enfeksiyon çalışmaları (AV: Balıklara uygulanan virüs miktarı (Log (TCID₅₀) ml⁻¹), NM: Doğal ölümler, DRM: Virüs kaynaklı ölümler, SI: Deney sonrasında hayatta kalan enfekte balıklar)

Grup	Karadeniz Alası						Gökkuşuğu Alabalığı						Kaynak Alası					
	AV	n	NM	DRM	%DRM	SI	AV	n	NM	DRM	%DRM	SI	AV	n	NM	DRM	%DRM	SI
H	6.2	50	6	4	8	1/4	5.9	50	1	4	8	0/4	5.4	49	2	3	6	0/5
	6.2	50	4	8	16	0/4	5.9	50	1	2	4	2/4	5.4	50	2	6	12	0/5
	6.2	50	7	17	34	2/4	5.9	50	3	5	10	2/4	5.4	50	3	3	6	0/5
M	5.2	50	7	0	0	1/4	4.9	50	1	3	6	2/4	4.4	51	3	0	0	0/5
	5.2	50	9	4	8	0/4	4.9	50	2	2	4	1/4	4.4	49	1	0	0	0/5
	5.2	50	5	2	4	0/4	4.9	50	2	6	12	0/4	4.4	49	0	2	4	0/5
L	4.2	50	8	0	0	0/4	3.9	50	2	1	2	1/4	3.4	49	1	0	0	0/5
	4.2	50	2	0	0	0/4	3.9	50	3	1	2	2/4	3.4	50	1	0	0	0/5
	4.2	50	4	1	2	0/4	3.9	50	3	1	2	0/4	3.4	50	1	0	0	0/5
LL	3.2	50	7	0	0	0/4	2.9	50	3	0	0	0/4	2.4	50	0	0	0	0/5
	3.2	50	5	1	2	0/4	2.9	50	1	0	0	0/4	2.4	49	1	0	0	0/5
	3.2	50	6	0	0	0/4	2.9	50	2	1	2	0/4	2.4	49	0	0	0	0/5
K	K1	50	4	0	0	0/4	K1	50	1	0	0	0/4	K1	49	0	0	0	0/5
	K2	50	5	0	0	0/4	K2	50	1	0	0	0/4	K2	51	1	0	0	0/5

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 2000–2001 eğitim öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği bölümünde lisans öğrenimine başladı ve 2004 yılı Haziran ayında mezun oldu.

2004–2005 eğitim öğretim yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Kasım 2005 tarihinde KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü 50/d kadrosuna araştırma görevlisi olarak atandı ve Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği bölümünde görevlendirildi. 2012 yılı Mart ayında buradaki görevinden ayrılarak Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na bağlı Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde (Trabzon) çalışmaya başladı ve halen buradaki görevine devam etmektedir. Orta derecede İngilizce bilmektedir. Evli ve iki çocuk babasıdır.

Tezden üretilmiş ve SCI kapsamındaki dergilerde yayınlanmış makaleler;

Altuntaş, C. ve Ögüt, H., 2010. Monthly Occurrence and Prevalence of Viral Haemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) in Whiting *Merlangius merlangus*, Diseases Of Aquatic Organisms, 88, 107-113.

Ögüt, H. ve Altuntaş, C., 2011. Virulence of Viral Haemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) Genotype 1e on Fry of Three Trout Species: Black Sea Trout (*Salmo trutta labrax*), Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*), Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 31(4), 139-146.

Ögüt, H. ve Altuntaş, C., 2014. A Survey of Viral Haemorrhagic Septicemia Virus in Cultured Sea Bass and Its Virulence on Juvenile of Sea Bass, *Dicentrarchus labrax* (Actinopterygii: Perciformes: Moronidae) and Gilthead Sea Bream, *Sparus aurata* (Sparidae), Acta Ichthyologica Et Piscatoria, 44, 1, 9-14.

Ögüt, H. ve Altuntaş, C., 2014. Survey of Viral Haemorrhagic Septicemia Virus in Wild Fishes in The Southeastern Black Sea, Diseases Of Aquatic Organisms, 109, 99-106.