



RESEARCH ARTICLE

J Res Vet Med. 2019; 38 (2) 17-23
DOI:10.30782/jrv.m.645054

Viral Hemorajik Septisemi Virusunun (VHSV) Fenotipik Karakterinin Virulans Üzerine Etkisinin Araştırılması

Yasemin ÇİÇEK^{1*}, Harun ALBAYRAK²

¹Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü 55200 Atakum-Samsun

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi 55139 Atakum – Samsun

Received 15.09.2019 Accepted 11.11.2019

Özet

Viral Hemorajik Septisemi Virüsü (VHSV) (Piscine novirhabdovirus), deniz ve tatlı su balıklarında enfeksiyonlara neden olan bir virustur. Bu çalışmada; Türkiye'de tatlı su (Gökkuşluğu alabalığı) ve deniz (Kalkan balığı) balıklarından izole edilen Bolu\06 ve TR-WS13G adlı iki VHSV izolatının farklı fenotiplerinin Gökkuşluğu alabalıklarındaki (Oncorhynchus mykiss) klinik bulgular, mortalite oranı ve patojenite üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada Bolu/06 ve TR-WS13G VHSV izolatları plak saflaştırma yöntemiyle saflaştırıldı. Test sonunda her iki izolata ait dar ve geniş plak oluşturan 4 farklı saflaştırılmış izolat 60-100 g ağırlığındaki gökkuşluğu alabalıklarına intraperitoneal olarak verilerek deneysel enfeksiyon oluşturuldu. Deneysel enfeksiyon sırasında ölen veya deneme sonucunda öldürülen balıklarda real time RT-PCR metodu ile VHSV viral nükleik asit varlığı ve miktarı araştırıldı. Deneysel enfeksiyon sonucunda mortalite oranı; kontrol grubunda %3,33, Bolu/06 dar ve geniş plak izolat gruplarında sırasıyla %43,3 ve %20, TR-WS13G dar ve geniş plak izolat gruplarında ise sırasıyla %33,3 ve %14,8 olarak tespit edildi. rRT-PCR testi sonucunda ölen\öldürülen balık örneklerinde viral kopya sayısı $1,67 \times 10^2 - 7,33 \times 10^4 / \mu\text{l}$ olarak tespit edildi. Fenotipik olarak hem tatlı su izolatu Bolu/06 hem de deniz izolatu TR-WS13G'nin dar plak çapına sahip izolatlarının geniş plak oluşturan izolatlarından daha yüksek mortaliteye neden olduğu, ayrıca gökkuşluğu alabalıklarından izole edilen tatlı su izolatu Bolu/06'nın kalkan balığından izole edilen deniz izolatu TR-WS13G'den daha patojen olduğu ortaya konulmuştur. Bu sonuçlar ile VHS virusunun fenotipik karakterinin virulans üzerinde önemli düzeyde etkili olduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Gökkuşluğu alabalığı; Plak Test; rRT PCR; Viral Hemorajik Septisemi Virüsü

Abstract

Abstract: Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (Piscine novirhabdovirus) causes infection in various marine and freshwater fish. It was aimed to determine the effect of different phenotypes of two VHSV isolates, Bolu\06 and TR-WS13G, isolated from fish living in freshwater (rainbow trout) and sea (turbot) in Turkey, on clinical findings, mortality rate and pathogenicity in Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). In this study, Bolu / 06 and TR-WS13G VHSV isolates were purified by plaque purification method. At the end of the test period, 4 different purified isolates, which form wide-narrow plaques of both isolates, were injected intraperitoneally to rainbow trout weighing 60-100 g and experimental infection was performed. Mortality rate due to experimental infection were detected as; %3.33 for control group; %43.3 for Bolu/06 narrow isolates group, %20 for Bolu/06 wide isolates group, %33.3 for TR-SW-13 broad isolates group; and %14.8 for TR-SW-13 narrow isolates group. The number of viral copies in the fish samples (dead/killed) were founded $\log_{10} 7.33 \times 10^4 - 1.67 \times 10^2 / \mu\text{l}$ by rRT-PCR. The phenotypic character of the wide narrow- plaque forming isolates freshwater isolation Bolu / 06 and marine isolation TR-WS13G, have a higher mortality rate than wide plaque-forming isolates of narrow-plate isolates. Freshwater isolation from rainbow trout isolation Bolu/06 more pathogenic than turbot isolated from marine isolate TR-WS13G. This result showed phenotypic character has been shown significantly effective on virulence.

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

* Corresponding author: Yasemin ÇİÇEK, Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü 55200 Atakum-Samsun Türkiye, cicekyasemin@gmail.com, +90 362 437 03 99

Giriş

Viral hemorajik septisemi virusu (VHSV; Piscine novirhabdovirus) (ICTV, 2016) Rhabdoviridae ailesinden Novirhabdoviridae cinsinde yer almaktadır. Viral hemorajik septisemi hastalığı birçok deniz ve tatlı su balık türlerinde (özellikle salmonoid, morina ve perciformes türleri) görülen sistemik bir enfeksiyondur (Bowen, 2011; Purcell ve vd., 2012; Skall ve vd., 2005).

Özellikle yavru balıklar enfeksiyona duyarlıdır. Mortalite genç balıklarda %100'e ulaşabilmektedir (Anonim, 2017; Bowen, 2011; Gadd, 2013; Kim ve Faisal, 2011). Hastalığın akut, kronik ve subklinik enfeksiyon formları vardır. Akut enfeksiyon semptomları soluk solungaçlar, ekzoftalmi ve yüzgeç kanamaları, uyuşukluk, sarmal yüzme ile karakterizedir. Bazı enfekte balıklarda gözle görülür belirti olmasa da, beyinde tropizm, anormal yüzme davranışıyla ortaya çıkan sinir şekliyle de sonuçlanabilmektedir (Bowen, 2011; Gadd, 2013; Kim ve Faisal, 2011). Virus, genellikle kaslar ve iç organlarda endotelial kan damarlarını hedef alarak nekrozlar oluşturur. Karaciğer, böbrek ve dalakta peteşiyal ya da ekimatöz hemorajiler oluşturur (Anonim, 2017; Pham vd., 2013; Skall vd., 2005).

Rhabdoviridae ailesi, kuduz, veziküler stomatit, sığır ephemeral fever virus ve bazı önemli balık rhabdoviruslarını da kapsayan birçok önemli hayvan ve insan viruslarını içermektedir. 2014 yılında Kongo Demokratik Cumhuriyeti'nde yapılan bir çalışmada, yeni bir rhabdovirus olan Bas-Congo virusu (BASV) tespit edilmiş ve insanlardaki akut hemorajik ateş virüsü ile yakınlık göstermesi açısından Rhabdoviridae ailesinin ilk örneği olmuştur (McAllister vd., 2014). Rhabdoviridae ailesinde hayvan viruslarını içeren on dört cins bulunmaktadır; Ephemerovirus, Lyssavirus, Nucleorhabdovirus, Vesiculovirus, Perhabdovirus, Sigmavirus, Sprivivirus, Tupavirus, Hapavirus, Ledantevirus, Sripuvirus, Tibrovirus, Almen-dravirus ve Novirhabdovirus cinsidir. Novirhabdovirus cinsi, önemli balık virusları olan Piscine novirhabdovirus, Hirame novirhabdovirus, Snakehead novirhabdovirus ve Salmonid novirhabdovirus'ları içermektedir (ICTV, 2016). VHSV virionları, yaklaşık 70 nanometre (nm) çapında ve yaklaşık 180 nm uzunluğundadır. Genom, 11 kilo baz (kb) boyutunda doğrusal, negatif polariteli, tek sarmallı RNA molekülüdür (Anonim, 2017; Bowen, 2011). Virusun gen dizilimi 3'-N-P-M-G-L-5'seklinindedir. N, viral nükleokapsitin ana bileşenini kodlayan nükleoprotein genidir. P, viral polimerazın bir ko-faktörüdür. M, nükleokapsite ve glikoproteininin sitoplazmik alanına bağlanarak virionun tomurcuklanmasını kolaylaştıran iç virion proteinidir. G, virion yüzeyindeki trimerleri oluşturan glikoproteindir ve aşı kaynaklı bağışıklığın hedefi olan

nötralizan epitoplara içerir. L, transkripsiyon ve RNA replikasyonunda işlev gören RNA bağımlı RNA polimerazdır. Novirhabdovirus olan VHSV, diğer rhabdoviruslara göre yapısal olmayan glikoprotein (G) ve polimeraz (L) geni arasında NV (protein nonvirion) geni ihtiva etmektedir. (Schutze vd., 1999).

Yapılan serolojik araştırmalar sonucunda, iki farklı VHSV suşunun varlığı kanıtlanmıştır; ancak daha sonra kahverengi alabalıklardan (*Salmo trutta* L.) üçüncü bir suşun varlığı ortaya konulmuştur (Kinkelin ve Berre, 1977). Tanımlanan genetik gruplandırma nötralizan edici G ve N genleri dikkate alınarak serotiplendirme yapılmakta ve dört genogrubunun (I-IV) olduğu kabul edilmektedir (Einer-Jensen vd., 2004; Einer-Jensen vd., 2014; Nishizawa vd., 2006; Schönherz vd., 2013). Virusun teşhisi, klinik belirtiler, histopatolojik bulgular, virusa duyarlı hücre kültürlerinden izolasyon, serolojik ve moleküler testler kullanılarak yapılabilmektedir. Virus, Epithelioma Papulosum Cyprini (EPC), Bluegill Fry (BF-2), Fathead Minnow (FHM), Chinook Somon Embriyo (CHSE-214) ve Rainbow Trout Gonad (RTG-2) gibi birçok hücre kültüründe üreyebilmektedir. Virusun üremesi için hücre kültürü ortamı pH 7,1 ve 15°C sıcaklık olarak belirlenmiştir (Anonim, 2017; Gadd, 2013; Kim ve vd., 2016).

Materyal Metot

Hücre ve Virus: RTG-2 hücresi ve Bolu VHSV izolatu (Genbank No: KM972678) İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden, TR-WS13G izolatu (Genbank No: KM972680) ise Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi. VHS virus izolatlarının üretilmesinde RTG-2 devamlı hücre hatları kullanıldı. RTG-2 devamlı hücre kültürleri -86°C' lik derin dondurucudan çıkartılarak içerisinde %10 fetal dana serum (FDS), %1 antibiyotik+antimikotik (10000 IU/ml penicilline, 10 mg/ml streptomisin, 0,025mg/ml amphotericin B, ve %1 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) bulunan Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM)/ Leibovitz's L-15 (L-15) ile çözülürerek, 25 ve 75 cm² yüzeyli doku kültürü flasklarında soğutmalı inkübatörde 20-22°C de üretildi.

RNA Ekstraksiyonu, rRT-PCR Kitleri, Primerler ve Prob: RNA ekstraksiyonunda ticari olarak temin edilen ekstraksiyon kiti (Qiagen, RNeasy Mini kit, Cat No: 74106, Hilden, Almanya) kullanıldı. Nükleik asit amplifikasyonunda ticari olarak temin edilen tek aşamalı PCR kiti (Rotor-Gene Probe RT-PCR kit, Cat No: 204574, Qiagen, Hilden Almanya) kullanıldı. Real Time RT-PCR (rRT-PCR) testinde G genine spesifik primerler ve prob kullanıldı, primerler ve probun dizileri ve lokalizasyonları Tablo 1'de gösterilmiştir. Nükleik asit amplifikasyonunda, rRT-PCR testin-

de pozitif kontrol olarak ve viral yük konsantrasyonunu ortaya koymak için virusun tüm G genini içeren plazmid (pGEM-T Easy vektör, Promega, ABD), negatif kontrol olarak ise distile su kullanıldı.

Tablo 1.Çalışmada kullanılan Primer ve prob dizileri ve lokalizasyon bölgeleri

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

Balık Örnekleri: Rutin kontrolleri yapılan ve geçmişinde VHS bildirimini bulunmayan çiftliklerden balık örnekleri alınarak rRT-PCR testi ile VHSV varlığı araştırıldı. Testler sonucunda VHSV tespit edilmeyen bir işletmeden sağlanan balık örnekleri deneme çalışmalarında kullanıldı. 60-100 gram ağırlığındaki 150 adet gökkuşağı alabalığı, Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü balık hastalıkları epruvasyon ünitesinde bulunan kapalı sistem balık tanklarına uygun koşullarda nakledildi. Deneme için kullanılacak balıklar adaptasyon için 7 gün tanklarda bekletildi. Balıkların uyum süreci ve deneysel enfeksiyon süresince günlük takibi ve rutin beslemesi yapıldı.

Metot

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

Virus Mikrotitrasyon Testi: Virusların DKID50 dozunu belirlemek amacıyla iki ayrı izolat için iki adet 96 gözlü mikrotitrasyon pleytine, virusun log₁₀ tabanına göre sulandırılmış dilüsyonları 10⁻¹'den 10⁻¹⁶'ya kadar 100 µl olarak eklendi. Hücre kontrol gözlerine 100 µl hücre üretme vasatı, virus kontrol gözlerine ise 50 µl sulandırılmamış virus ile 50 µl hücre üretme vasatı konuldu. Tüm gözlerle 50

µl RTG-2 hücresi eklendi. Hazırlanan pleytler, hücrelerin tutunması için 22°C etüve kaldırıldı. 24 saat sonra 15-16°C 'lik etüve alındı ve günlük olarak CPE yönünden kontrolleri yapıldı. 7 gün inkubasyondan sonra Spaerman ve Kaerber metodu ile virusların DKID50 değerleri hesaplandı.

Plak Test: DKID50'leri hesaplanan viruslar Çiçek (2018)'de belirtilen şekilde plak testine tabi tutuldu. Kültür ortamı bir agar (veya agaroz) jel ile katılaştırıldı. İlk virus ekimi ve sabitleme tabakasının uygulanmasının ardından, viral enfeksiyon ve replikasyonu çevreleyen tabaka ile sınırlandırıldığı için, bireysel plaklar veya hücre ölümü bölgeleri gelişmeye başladı. Enfekte olmuş hücreler, replikasyon-liziz enfeksiyon döngüsünde devam ederek ve giderek daha belirginleşen ayrı plaklar oluşturdu. Plak sayısının en az olduğu gözdeki plakların çapları ölçülerek plaklar dar (1mm'den küçük çaplı) ve geniş (1 mm'den büyük çaplı) olarak işaretlendi. İnce uçlu enjektör yardımıyla plakların içerisine girilerek 200 µl hacminde virus toplandı. Her bir fenotipik örnek tekrar hücre kültürüne ekilerek plak testi 3 defa tekrarlandı.

Balıklara Virus İnokülasyonu: Balıklara yapılacak tüm müdahalelerde, balıklar MS-222 (30mg/lit) ile anesteziye alınarak enjeksiyon uygulandı. Denemeler boyunca tank suyu sıcaklıkları 13 0C olacak şekilde sabit tutuldu. Balıklar 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ışık altında tutuldu. Kontrol grubundaki 30 balığa 0,1 ml PBS intraperitoneal olarak uygulandı. 2. gruptaki 30 balığa Bolu/06 geniş çaplı plak oluşturan izolat, 3. gruptaki 30 balığa Bolu/06 dar çaplı plak oluşturan izolat, 4. gruptaki 27 balığa TR-WS13G geniş çaplı plak oluşturan izolat, 5. gruptaki 27 balığa TR-WS13G dar çaplı plak oluşturan izolattan intraperitoneal yolla 1x10⁴ DKID50/balık dozunda virus epruve edildi. Balıklar 30 gün boyunca gözlemlendi.

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

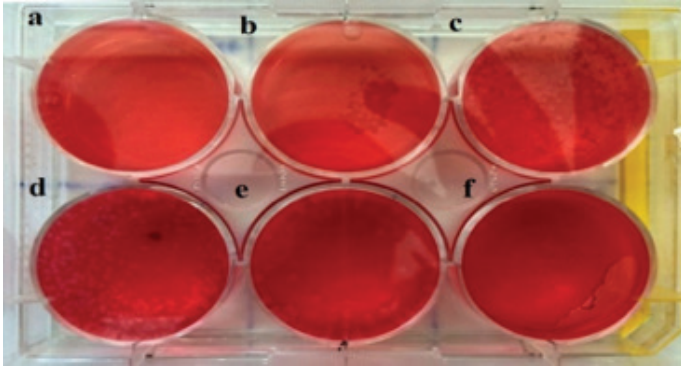
RNA Ekstraksiyonu: RNA ekstraksiyonu ticari olarak temin edilen ekstraksiyon kiti (Qiagen, RNeasy Mini kit, Cat No: 74106, Hilden, Almanya) ile protokolü doğrultusunda yapıldı.

rRT-PCR: rRT-PCR testleri LightCycler 2.0 (Roche, Rotkreuz, İsviçre) cihazında ve tek aşamalı PCR kiti üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerçekleştirildi. rRT-PCR testinde revers transkripsiyon basamağı için 500C'de

10 dakika, reverse transkriptaz enzim inaktivasyonu için 950C'de 5 dakika uygulandı. Bunu takiben 40 siklus boyunca, ön denatürasyon için 950C'de 5 saniye, annealing basamağı için 600C'de 10 saniye inkübasyona bırakıldı. Son olarak ise soğutma basamağında 120C'de süresiz bekletildi.

BULGULAR

Plak testi sonucunda; her bir izolat için 1mm'nin altındaki plaklar dar plak, 1mm'nin üstündeki plaklar ise geniş plak olarak tiplendirildi. Bu işlem 3 kez tekrarlanarak virus izolatlarının saflaştırılması yapıldı. Dar ve geniş plak oluşturan virusların titreleri ayrı ayrı hesaplandı. Üçüncü plak saflaştırma testinden sonra virusların titresi VHSV Bolu-geniş plak için 106/0,1 ml, Bolu-dar plak için 105/0,1 ml; TR-WS13G-geniş plak için 107/0,1 ml, TR-WS13G-dar plak için 105,5/0,1 ml olarak hesaplandı. log₁₀ tabanına göre sulandırılan Bolu VHSV suşunun geniş plak görüntüsü şekil-1'de gösterilmiştir.

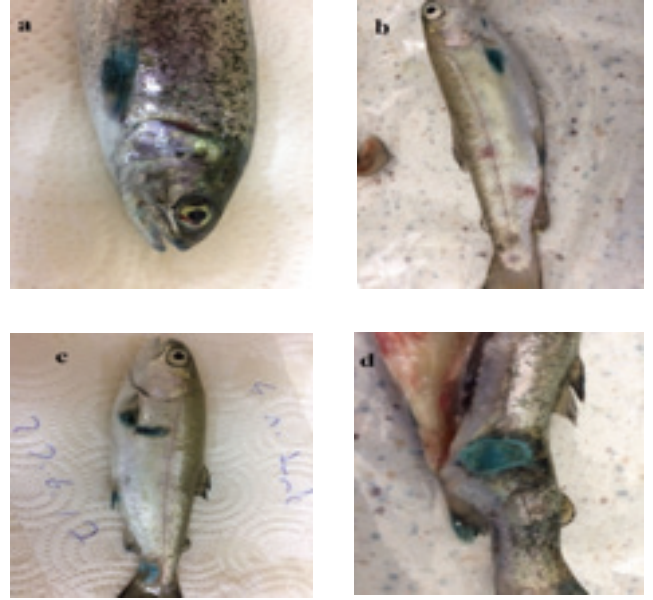


Şekil 1. Plak testi sonucu (a; 10-1 dilüsyon b; 10-2 dilüsyon c; 10-3 dilüsyon d; 10-4 dilüsyon e; 10-5 dilüsyon f; 10-6 dilüsyon)

Eprüvasyonu takiben deneme gruplarında yapılan gözlemlerde mortalite oranları Tablo 2'de gösterilmiştir. Hasta balıklar üzerinde yapılan gözlem ve ölen balıklarda yapılan nekropsi bulgularında deri renginde koyulaşma, anemi, ekzoftalmus, ülserasyon, solungaçlarda belirgin soluklaşma, göz çevresi, kuyruk ve gövde üzerinde erozyon ve epidermal kanama odakları gözlemlenmiştir.

Tablo 2. Deneme gruplarında mortalite oranları

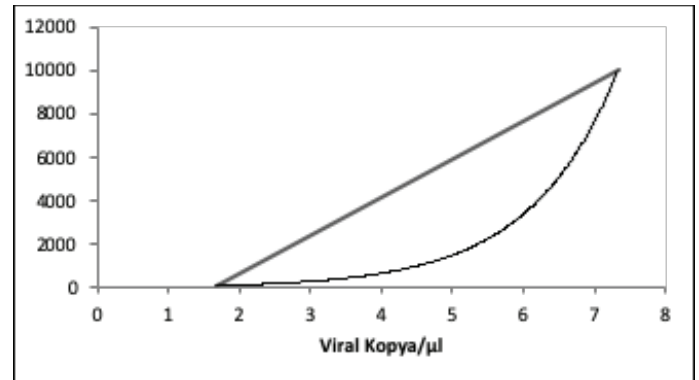
Kontrol Tankı	Bolu/06 Dar Plak Oluşturan Saf İzolat	Bolu/06 Geniş Plak Oluşturan Saf İzolat	TR-WS13G Dar Plak Oluşturan Saf İzolat	TR-WS13G Geniş Plak Oluşturan Saf İzolat
1/30 (%3,33)	13/30 (%43,3)	6/30 (%20)	9/27 (%33,3)	4/27 (%14,81)



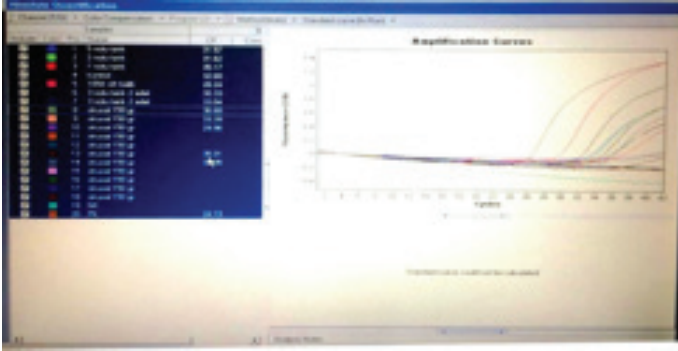
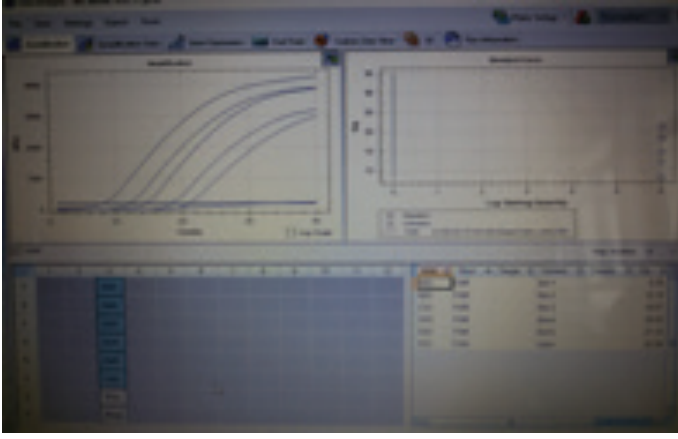
Şekil 2. Makroskopik nekropsi bulguları (a; gözde hemoraji, b; vücut yüzeyinde hemoraji, c; kuyruktaki erozyon, d; yüzgeç bölgesinde erozyon)

rRT-PCR sonuçlarına göre; kontrol grubunda ölen öldürülen balıklardan yapılan ekstraksiyonlarda VHSV RNA'sı tespit edilememiştir. Virus uygulanan deneme gruplarında ise ölen veya öldürülen tüm balıkların organ homojenizatlarından elde edilen ekstraktların tamamında VHSV RNA'sı tespit edilmiştir. Test sonucunda ölen balık örneklerinde log₁₀ 7,33x10⁴-1,67x10²/µl arasında viral kopya sayısı tespit edildi.

Tablo 3. Balık örneklerindeki viral kopya sayısı



CT(Cycle threshold) seviyeleri, numunedeki hedef nükleik asit miktarıyla ters orantılıdır. CT seviyesinin düşük olması, numunedeki hedef nükleik asidin miktarını artırır. Balık organ örneklerinde en yoğun CT değeri 28,35 olarak kaydedildi. Çalışmamızda CT değeri 35 ve sonrası negatif kabul edilmiştir.



Şekil 4. Pozitif kontrol plazmidlerle elde edilen ışına eğrileri ve balık örneklerinden elde edilen RNA'ların oluşturduğu ışına eğrileri (Kontrol; pürifiye edilmemiş virus, 1 nolu tank; virus verilmeyen kontrol grubu, 2 nolu tank; Bolu/06 geniş çaplı plak oluşturan izolat, 3 nolu tank; Bolu/06 dar çaplı plak oluşturan izolat, 4 nolu tank; TR-SW13G geniş çaplı plak oluşturan izolat, 5 nolu tank; TR-SW13G dar çaplı plak oluşturan izolat)

Tartışma ve Sonuç

VHSV, ülkemizde ilk olarak 2004 yılında kültüre alınan kalkan balıklarında teşhis edilmiş, (Kalaycı vd., 2006) 2005 yılında ise virusun ilk izolasyonu yapılmıştır. Bulunan virusların tamamı genotip Ie ile ilişkilendirilmiştir (Nishizawa vd., 2006). 2015 yılında yapılan bir çalışmada Doğu Karadeniz doğal balık türleri üzerinde VHSV prevalansı incelenmiş ve karadeniz alabalığı'nın (%34 mortalite) en duyarlı tür olduğu tespit edilmiştir. Levrek %25, çipura %15, gökkuşuğu alabalığı ve kaynak alabalıkları %12 mortalite göstermiştir. İzole edilen virusların tamamı VHSV genotip-Ie'ye ait olduğu tespit edilmiştir (Altuntas, 2015). Çalışmamızda deneysel enfeksiyon sırasında balıklarda deri renginde koyulaşma, anemi, ekzoftalmi, ülserasyon, solungaçlarda belirgin soluklaşma, göz etrafı, kuyruk ve gövde üzerinde erozyon ve epidermal kanama odakları gözlemlendi ve toplam Mortalite oranı ise toplamda % 22,9 olarak belirlenmiştir. Deneysel enfeksiyonun 15-17. günlerinden itibaren ölen balıklarda external semptomların şiddetlendiği gözlemlenmiştir. Özellikle Bolu\06 izolatının verildiği balıklarda kuyrukta ve yüzgeçlerde

şiddetli erozyon, göz etrafında kanamalar gözlemlenmiştir. Bulgular, gökkuşuğu alabalıklarında Bolu\06 ile yapılan deneysel enfeksiyonlardaki semptomlarla tutarlılık göstermektedir. Işıdan vd. (2014) tarafından, VHSV genotip Ie suşlarının çipura ve levrek balıklarında virulansını belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, TR-SW13/G izolatı ile çipuraya yapılan enjeksiyon ve daldırma yöntemleriyle toplamda 60 balıktan 10 tanesinin öldüğü tespit edilmiştir. TB13/H15 izolatıyla yapılan denemede 30 balıktan sadece 1 balığın öldüğü tespit edilmiştir. Levrek denemelerinde ise TR-SW13/G izolatı verilen balıklarda enjeksiyon yöntemiyle yapılan denemede 30 balıktan 2 balığın öldüğü gözlemlenmiş, TB13/H15 izolatı verilen balıklarda ise enjeksiyon denemesinde 30 balıktan 3, daldırma denemesinde ise 30 balıktan sadece 1 balığın öldüğü tespit edilmiştir ve toplam mortalite oranının çipuralarda % 13,33 bulunurken, levrek balıklarında % 5 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara bağlı olarak bu balıkların duyarlılıklarının düşük olduğu ortaya konulmuştur (Işıdan ve Kutlu, 2014). Bu çalışmada ise TR-SW13/G izolatı verilen 54 balıktan 13 tanesinin öldüğü, mortalite oranının ise % 24,07 olduğu tespit edilmiştir. Bolu\06 izolatı verilen 60 balıktan 19 tanesinin öldüğü ve mortalite oranının % 31,6 olduğu belirlenmiştir. Çalışmada yöntem olarak kullanılan plak testi, hücre kültürü vironlarının ve antiviral maddelerin miktarının tespiti için kullanılan en yaygın metottur. Test genellikle, hücrelerde enfekte olma ve replikasyon yeteneğini koruyan virusların nicel olarak sayısını bilmek açısından faydalıdır. Ayrıca virusun saflaştırılmasını ve klonlanmasını kolaylaştırır (Burke ve Mulcahy, 1980; Dobos, 1976; Escobar-Herrera, 2007). VHSV, doğrudan hücreden hücreye yayılımı ile lokalize plaklar oluşturur. Çalışmamızda, VHS virus izolatları için kaplama materyali olarak kullanılan agarozun belirgin plaklar oluşturduğunu ve virusun Bolu/06 izolatında titrenin arttığı (Bolu/06 dar plak 106 /0,1 ml, Bolu/06 geniş plak 105 /0,1 ml), TR-SW13/G izolatında ise titrenin azaldığı (TR-SW13/G geniş plak 107 /0,1 ml, TR-SW13/G dar plak 105,5/0,1 ml) tespit edilmiştir. Dar plak çapına sahip her iki izolatında, geniş plak çapına sahip izolatlardan daha patojen olduğu ve mortalite oranları doğrultusunda gökkuşuğu alabalıklarında Bolu\06 izolatının daha patojen olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Çalışmada G genine spesifik primerler ve prob kullanıldı. Pozitif kontrol olarak ise virusun tüm G genini içeren plazmid kullanıldı. Çalışmada CT değerinin en yoğun 28,35 olarak kaydedilmiş ve her numunede VHSV RNA'sı bulunmuştur. Sonuç olarak yapılan çalışmada VHS virusunun kalkan balığından izole edilen TRSW13 izolatının, alabalıklardan izole edilen Bolu\06 izolatına göre gökkuşuğu alabalıklarında daha düşük mortalite gösterdiği ortaya konulmuştur.

Her iki izolatin dar plak oluşturan saflaştırılmış virusların, geniş plak oluşturanlara göre daha patojen olduğu tespit edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, PYO.VET.1904.17.009 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi BAP Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

Referanslar

- Altuntas C. 2015. Viral hemorajik septisemi virüsü'nün (VHSV) Doğu Karadeniz'de yaşayan doğal balık türlerinde yayılımı, epidemiyolojisi ve kültür balıkları üzerine virülensi [Doktora Tezi] Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Anonim 2017. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. http://www.Anonim.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_vhs.pf2017.
- Blanda F, Snow M, Garver KA, Matejusova I. 2013. Genotype-specific Taqman® assays for the detection and rapid characterisation of european strains of viral haemorrhagic septicaemia virus. *J Virol Methods*. 187: 209–214. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.10.005.
- Bowen RA. 2011. Fenner's veterinary virology. 4rd Ed, San Diego, Academic Press is an imprint of Elsevier. 327-341.
- Burke JA, Mulcahy D. 1980. Plaquing procedure for infectious hematopAnonimtic necrosis virus. *J Appl Environ Microbiol*. 4: 872-876.
- Calleja F, Godoy MG, Cárcamo JG, Bandín I, Yáñez AJ, Dopazo CP, Kibenge FS, Avendano-Herrera R. 2012. Use of reverse transcription-real time polymerase chain reaction (real time RT-PCR) assays with universal probe library (upl) probes for the detection and genotyping of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated in Chile. *J Virol Methods*. 183: 80–85. doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.03.022.
- Cicek Y. 2018. Viral Hemorajik Septisemi Virusunun (VHSV) Fenotipik Karakterinin Virulans Üzerine Etkisinin Araştırılması [Yüksek Lisans Tezi] Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Cutrin JM, Olveira JG, Bandín I, Dopazo CP. 2009. Validation of real time RT-PCR applied to cell culture for diagnosis of any known genotype of viral haemorrhagic septicaemia virus. *J Virol Methods*. 162: 155–162. doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.07.033.
- Einer-Jensen K, Ahrens P, Forsberg R, Lorenzen N. 2004. Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J Gen Virol*. 85: 1167–1179. doi.org/10.1099/vir.0.79820-0.
- Einer-Jensen K, Harmache A, Biacchesi S, Bremont M, Stegmann A, Lorenzen N. 2014. High virulence differences among phylogenetically distinct isolates of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus are not explained by variability of the surface glycoprotein G or the nonvirion protein Nv. *J Gen Virol*. 95: 307–316. doi.org/10.1099/vir.0.057448-0.
- Gadd T. 2013. Fish rhabdoviruses; viral haemorrhagic septicaemia 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. 18-38.
- Herzog P, Drosten C, Müller MA. 2008. Plaque assay for human coronavirus NL63 using human colon carcinoma cells. *Virol J*. 5: 138. doi.org/10.1186/1743-422X-5-138.
- Isıdan H, Kutlu İ. 2014. Viral hemorajik septisemi virüs genotip 1e suşlarının çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) balıkları üzerinde patojenitelerinin belirlenmesi. *Yunus Araştırma Bülteni*. 2: 49-53. doi: 10.17693/yunus.26244.
- Kalaycı G, Incoğlu S, Ozkan B. 2006. First isolation of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus from turbot (*Scophthalmus maximus*) cultured in the Trabzon coastal area of the black sea in Turkey. *B Eur Ass Fish Path*. 26: 157- 162.
- Kim MS, Kim KH. 2013. The role of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) NV gene in TNF- α and VHSV infection-mediated NF-KB activation. *Fish Shellfish Immunol* 34: 1315-1319. doi: 10.1128/JVI.00279-17.
- Kim R, Faisal M. 2011. Emergence and resurgence of the viral haemorrhagic septicaemia virus (Novirhabdovirus, Rhabdoviridae, Mononegavirales) *J Adv Vet Anim Res*. 2: 9–23. doi.org/10.1016/j.jare.2010.05.007.
- Kinkelin P, Berre LM. 1977. Isolement d'un rhabdovirus pathogene de la truite fario (*Salmo trutta*, L.). *C r Acad Sci Paris, Serie D*. 284: 101-104.
- Matejusova I, Mckay P, Mcbeath AJA, Collet B, Snow M. 2008. Development of a sensitive and controlled real-time RT-PCR assay for viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in marine salmonid aquaculture. *Dis Aquat Organ*. 80: 137–144. doi.org/10.3354/dao01911.
- Matrosovich M, Matrosovich T, Garten W, Klenk HD. 2006. New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virol J*. 3: 63. doi: 10.1186/1743-422X-3-63.
- McAllistera J, Gaucia PJ, Mitchell IR, Boyle DB, Bulach DM, Weir RP, Melville LF, Davis SS, Gubala AJ. 2014. Genomic characterisation of alpmiwar virus, harrison dam virus and walkabout creek virus; three

- novel rhabdoviruses from northern Australia. *Virology* 517: 1-17. doi.org/10.1016/j.virep.2014.09.001.
21. Nishizawa T, Savas, H, Isıdan H, Ustündağ C, Iwamoto H, 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. doi.org/10.1128/AEM.72.4.2373-2378.2006.
 22. Pham PH, Lumsden JS, Tafalla C, Dixon B, Bols NC. 2013. Differential effects of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) genotypes IVa and IVb on gill epithelial and spleen macrophage cell lines from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 34: 632-640. doi.org/10.1016/j.fsi.2012.12.004.
 23. Purcell MK, Hart SA, Kurath G, Winton JR. 2006. Strand-specific, real-time RT-PCR assays for quantification of genomic and positive-sense RNAs of the fish rhabdovirus, infectious hematopoietic necrosis virus. *J Virol Methods.* 132: 18–24. doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.08.017.
 24. Schönherz AA, Lorenzen N, Einer-Jensen K. 2013. Inter-species transmission of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from turbot (*Scophthalmus maximus*) to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Gen Virol.* 94: 869–875. doi: 10.1099/vir.0.048223-0.
 25. Schütze H, Mundt E, Mettenleiter TC. Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus Genes* 1999; 19: 59–65. doi: 10.1023/A:1008140707132.
 26. Skall HF, Olesen NJ ve Møllergaard S. Viral haemorrhagic septicemia virus in marine fish and its implications for fish farming. *J Fish Dis* 2005; 28: 509–529. doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00654.x.