

Baskı Provası

Araştırma Makalesi
Research Article**Viral Hemorajik Septisemi Virüs Genotip 1e Suşlarının Çipura (*Sparus Aurata*) ve Levrek (*Dicentrarchus Labrax*) Balıkları Üzerinde Patojenitelerinin Belirlenmesi**Hakan İŞİDAN^{1*}, İlyas KUTLU²¹ Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, 58140, Sivas, Türkiye² Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü, 61250, Yomra, Trabzon, Türkiye* Sorumlu yazar: Tel:+90 5416102995 Faks:+90 3462191812
e-posta: hisidan@cumhuriyet.edu.tr

Geliş Tarihi: 22.11.2013

Kabul Tarihi: 08.01.2014

Abstract

In this study, we have aimed the determination of susceptibility of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*) which they have been cultured in Turkey to viral haemorrhagic septicemia virus. For this purpose, an infection trial has been conducted on a number of 360 sea bass and sea bream with using TB13/H15 and SW13/G isolates. The dose of infection applied as 10^{-5} TCID₅₀ ml⁻¹ for infection via immersion and 10^{-5} TCID₅₀ /fish for intraperitoneal infection. As a result of the infection trial, the average mortality rate for sea bream and sea bass has been found as 13,3 % and 5 % in the intraperitoneal infections. At the end of the study, virus was not isolated from dead or alive fish which infected by immersion. In conclusion, it has been founded that viral haemorrhagic septicemia virus (Genotype 1e strains) has low pathogenicity on the sea bass and sea bream.

Keywords: viral hemorrhagic septicemia virus; pathogenicity; infection trial; sea bass, *Dicentrarchus labrax*; sea**Özet**

Bu çalışmada, Türkiye'de kültürü yapılan çipura ve levrek balıklarının ülkemizden izole edilen, viral hemorajik septisemi virüs genotip 1e suşlarına karşı duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla TB13/H15 ve SW13/G izolatları ile 360'ar adet çipura (*Sparus aurata*) ve Levrek (*Dicentrarchus labrax*) üzerinde enfeksiyon denemesi gerçekleştirildi. Enfeksiyon dozu intraperitoneal 10^{-5} DKID₅₀ /balık ve daldırma 10^{-5} DKID₅₀ ml⁻¹ olarak uygulandı. Yapılan enfeksiyon denemesinin sonunda çipuralarda en yüksek mortalite oranı % 13,33 bulunurken levrek balıklarında % 5 olarak bulundu. Ölen ve hayatta kalan balıklardan hücre kültüründe yapılan ekimler sonunda, daldırma yoluyla virüs verilen balıkların hiçbirisinden yeniden virüs izolasyonu yapılamadı. Sonuç olarak yapılan çalışma ile viral hemorajik septisemi virüsün çipura ve levrek balıklarında düşük patojeniteye sahip olduğu ortaya konuldu.

Anahtar Kelimeler: Viral Hemorajik Septisemi Virüs; patojenite; enfeksiyon denemesi; çipura, *Dicentrarchus labrax*;**Giriş**

Viral hemorajik Septisemi, gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), kahverengi alabalık (*Salmo trutta*), grayling (*Thymallus thymallus*), whitefish (*Coregonus* sp.), pike (*Esox lucius*), largemouth bass (*Micropterus salmoides*), Japanese flounder (*Paralichthys*

olivaceus) ve kalkan (*Scophthalmus maximus*) balıklarının da içinde bulunduğu pek çok türün enfeksiyöz viral bir hastalığıdır ve viral hemorajik septisemi virüs (VHSV) tarafından oluşturulur (Winton vd., 1989; Mortensen vd., 1999; Schlotfeldt vd., 1991).

Viral hemorajik septisemi virüsü 1988 yılına kadar yalnızca tatlı su balık türlerini enfekte eden bir etken olarak bilinmekteydi. Kuzey Amerika'da 1988 yılında chinook ve coho salmon balıklarından, daha sonradan Kuzey Amerika'da en az 18 farklı balık türünden de izole edilmiştir (Winton vd., 1989). Denizden 1980'li yıllarda ilk VHSV izolasyonunun ardından Kuzey Amerika, Asya ve Avrupa'dan en az 48 farklı türden daha VHSV belirlenmiştir. Yalnızca Kuzey Avrupa'dan ringa, çaça balığı, morina, Norveç yayın balığı ve yassı balıkları da içine alan 15 türden VHSV izole edilmiştir (Hedrick vd., 2003; Mortensen vd., 1999; Takano vd., 2000). İzolasyonların çoğu Baltık Denizi, Kattegat, Skagerrak, Kuzey Denizi ve İskoçya civarındaki sulardan gerçekleştirilmiştir (Skall vd., 2005a).

Ülkemizde ilk izolasyon 2004 yılında, Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsünde kültür çalışmaları yapılan kalkan balıklarından alınan örneklerden yapılmıştır (Nishizawa vd., 2006; Kalaycı vd., 2007).

Gereç ve Yöntem

Balıklar

Enfeksiyon denemelerinde kullanılacak olan çipura "*Sparus aurata*" ve levrek "*Dicentrarchus labrax*" balıkları İzmir'de akuakültür yapan bir işletmeden (Kılıç Deniz Ürünleri A.Ş.) temin edilmiştir. Deneyde kullanılacak çipuralar, 4-6 cm boy (~5,2 cm) ve 3-4 g (~3,4 g) ağırlığa erişmiş olup her tanka 60 adet olacak şekilde dağıtıldı. Levrekler ise 5-7 cm boy (~5,9 cm) ve 3-4 g (~3,6 g) ağırlığa erişmiş olup her tanka 60 adet olacak şekilde dağıtıldı. Enfeksiyon denemesi öncesinde balıklar 2 haftalık adaptasyona tabi tutuldu.

Virüsler

Çalışmada kullanılan virüslerden biri 2005 yılında Trabzon ili açıklarından yakalanan ve diğeri ise Trabzon Su Ürünleri Merkez

Araştırma Enstitüsü yetiştirme ünitesinden alınan kalkan balıklarından izole edilen TR-WS13G ve TR-B13/15H (GeneBank kayıt numaraları; AB231160, AB231161) izolatlarıdır.

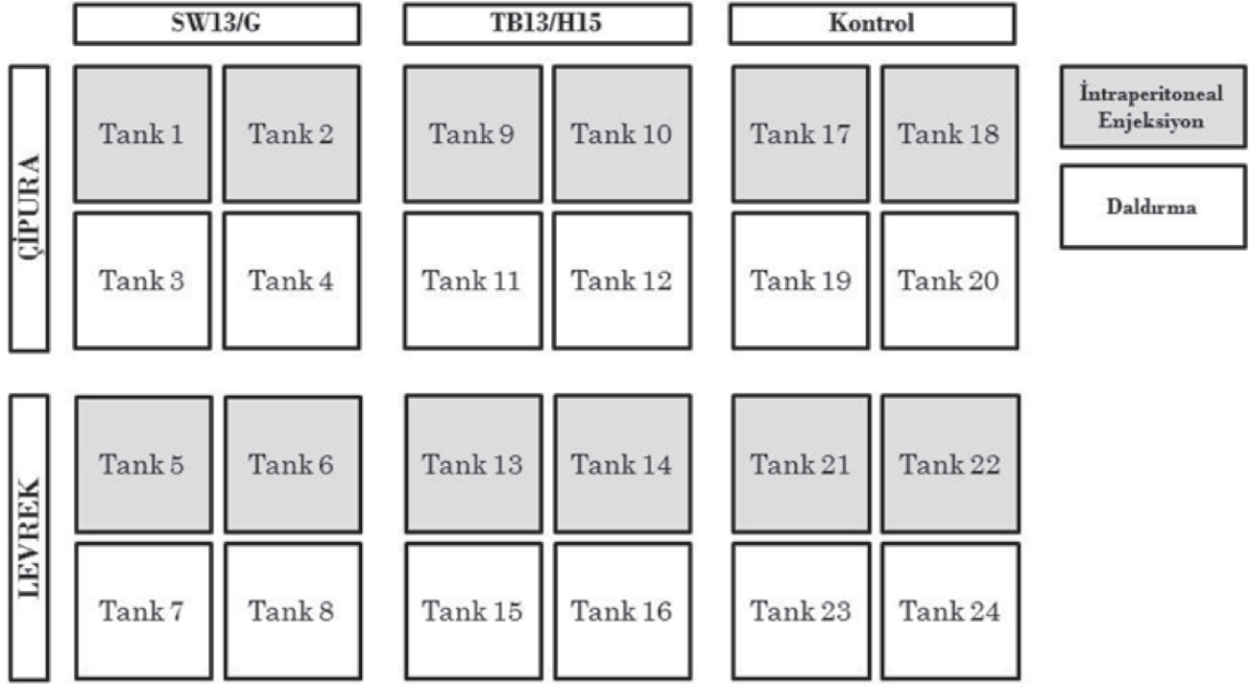
Enfeksiyon Denemeleri İçin Virüslerin Hazırlanması

Enfeksiyon denemesinde kullanılacak virüslerin titrasyonu için bir gün önce 96 kuyucuklu pleytte hazırlanmış BF-2 hücreleri kullanıldı. Bu amaçla her virüsün daha önceden -80°C'de saklanan viallerinden birisi açılarak vortekslenip 100 µl alındı. Alınan virüsün (%1 HEPES ilaveli MEM Earle vasatı) kullanılmak suretiyle 10⁻¹'den 10⁻¹⁰'a kadar 10 tabanlı seri sulandırılmaları hazırlandı.

Hazırlanan virüs sulandırılmalarının her sulandırması dört göze olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre pleytine 100 µl ilave edildi. Virüs ekimi gerçekleştirilen hücreler 15°C'deki inkübatörde inkübasyona bırakılarak sitopatik etki (CPE) yönünden günlük kontrolleri yapıldı. CPE gözlemlendikten sonra sonuçlar kaydedilerek Spermann-Köerber metoduyla DKID₅₀ (doku kültürü enfektif doz 50) hesaplandı. Enjeksiyon yoluyla yapılan enfeksiyon denemesinde her balığa 10⁻⁵ DKID₅₀, immersiyon yoluyla yapılan uygulamada ise havuzdaki suyun her ml'sine 10⁻⁵ DKID₅₀ olacak şekilde enfeksiyonlar gerçekleştirildi.

Deneme Tanklarının Hazırlanması ve Deney Tasarımı

DeneySEL enfeksiyonların gerçekleştirilebileceği 24 adet 50 lt'lik deneme tankı hazırlandı. Her tanka 30'ar adet olmak üzere toplam 360 adet çipura ve bir o kadar da levrek konularak balıklar adaptasyon süresi boyunca gözlemlendi. Enfeksiyon denemesi toplamda 2 tür, 2 tekrar, 2 suş, 2 uygulama şekli ve kontrolleri ile birlikte şekil 1 de şematize edildiği şekilde uygulandı.



Şekil 1. Enfeksiyon denemelerinin yapıldığı tank düzeni.

Virolojik Muayene

Enfeksiyon denemesi süresince ölen balıklar ile denemenin sonlandırılmasının ardından sağ kalan balıklardan alınan kalp ve ön böbrek örneklerinden hücre kültüründe virüsün yeniden izolasyonu çalışıldı. Bu amaçla doku homojenatları hazırlanarak, hazırlanan doku homojenatı 1/10 oranında hücre üretme vasatı ile sulandırılıp 0,45µm enjektör filtreden (Sartorius AG, Goettingen, Almanya) geçirildi. Daha sonra 100 µl süzüntü daha önceden hazırlanmış olan ve % 2 FBS ilaveli MEM vasatında çoğaltılan, % 80 monolayer olmuş 24 kuyucuklu pleyttteki (Grainer-Bio-one GmbH, Frickenhausen, Almanya) BF-2 ve/veya RTG-2 hücrelerine ekildi. Ekimde her örnek için iki kuyucuk kullanıldı.

Hücreler CPE gözleninceye kadar 15°C'de 2 hafta boyunca inkübatörde (MIR-153, Sanyo, Japonya) inkübe edildi ve her iki günde bir CPE varlığı yönünden invert mikroskop (CK30, Olympus Opt. Co., Japonya) kullanılarak kontrol edildi. İki haftalık inkübasyon sonunda CPE gözlenmeyen

örnekler yeniden 24 kuyucuklu pleytte hazırlanan hücre hattına 100 µl inokule edilerek subkültürü yapıldı. Bir hafta daha 15°C'de inkübasyona bırakıldı. Subkültür işleminin ardından CPE göstermeyen örnekler negatif olarak değerlendirildi ve muayene sonuç formuna kaydedildi.

Bulgular ve Tartışma

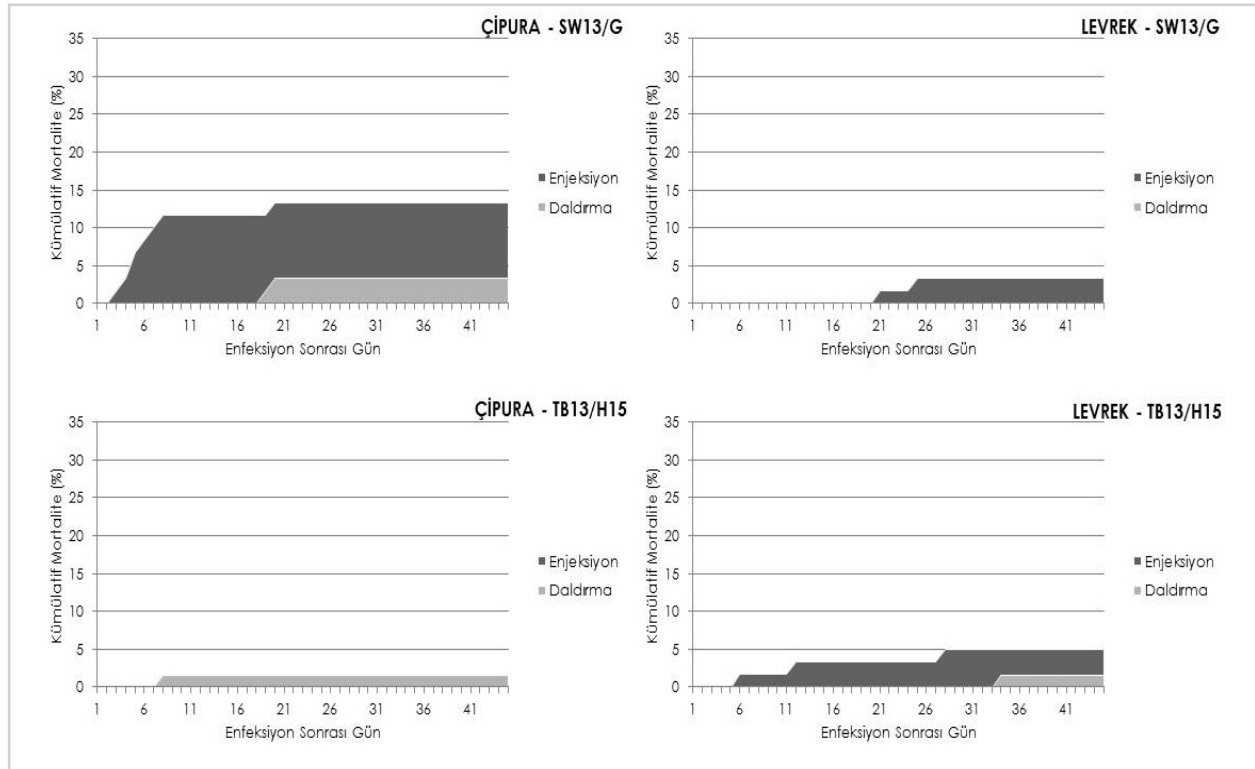
Viral hemorajik septisemi virüsü Türkiye suşları kullanılarak çipura ve levrek balıklarında enfeksiyon denemeleri gerçekleştirildi.

Çipuralar üzerinde SW13/G izolatu ile yapılan deneme enfeksiyonu çalışmasında intraperitoneal enjeksiyon yoluyla yapılan denemede toplam 8 balık daldırma yoluyla yapılan denemede ise 2 balık öldü. Buna göre kümülatif mortalite intraperitoneal enjeksiyon grubunda % 13,33 ve daldırma grubunda % 3,33 olarak gerçekleşti. Diğer taraftan TB13/H15 izolatıyla yapılan denemede ise intraperitoneal enjeksiyon grubunda hiç ölüm olmazken daldırma grubunda 1 balık öldü (% 1,66 kümülatif mortalite).

Levrekler üzerinde SW13/G izolatu ile yapılan deneme enfeksiyonu çalışmasında intraperitoneal enjeksiyon yoluyla yapılan denemede toplam 2 balık ölümlerine daldırma yoluyla yapılan denemede hiç ölüm gözlenmedi. Buna göre SW13/G izolatu kullanılarak intraperitoneal enjeksiyon yoluyla yapılan denemede kümülatif mortalite % 3,33 olarak gerçekleşti. Diğer taraftan TB13/H15 izolatıyla yapılan denemede ise intraperitoneal enjeksiyon grubunda 3. daldırma grubunda ise 1 balık öldü. Buna göre kümülatif mortalite intraperitoneal enjeksiyon grubunda % 5 ve daldırma % 1,66 olarak gerçekleşti. Diğer taraftan yapılan denemelerde kontrol gruplarındaki balıkların tamamı deney sonuna kadar canlı kaldı. Tüm deneme gruplarına ilişkin günlük kümülatif mortalite oranları şekil 2'de gösterilmiştir.

Çeşitli balık türlerinin viral hemorajik septisemi virüsüne duyarlılığı çokça çalışıl-

mıştır (Skall vd., 2005b). Daha önceki çalışmalar viral hemorajik septisemi virüsünün farklı genotiplerinin balık türleri arasında duyarlılık bakımından farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur (Snow vd., 2004). Diğer taraftan henüz çipura ve levrek balıklarından virüs izolasyonu gerçekleştirilmemiştir. Bununla birlikte levrek balıklarının viral hemorajik septisemi virüsü ile oluşturulan deneysel enfeksiyona duyarlılığı gösterilmiştir (Castric ve de Kinkelin, 1999). Çipura balıkları ile ise yapılmış bir enfeksiyon denemesi literatürde yer almamakla birlikte benzer türlerden olan red sea bream ve black sea bream balıklarının deneysel olarak oluşturulan enfeksiyona duyarlı oldukları ortaya konulmuştur (Isshiki vd., 2003; Ito vd., 2004). Yapılan bu çalışma, çipura ve levrek balıklarının viral hemorajik septisemi virüsü genotip 1e suşları ile gerçekleştirilen enfeksiyon denemesine az da olsa duyarlılık gösterdiklerini ortaya koymaktadır.



Şekil 2. Çipura ve levrek balıklarında TB13/H15 ve SW13/G izolatları ile yapılan enfeksiyon denemesinin kümülatif mortalite oranları.

Kaynaklar

- Castric, J. ve 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: 203–212.
- 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 hemorrhagic septicemia virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55: 211–220.
- Isshiki, T., Nagano, T. ve Miyazaki, T. 2003. Susceptibility of various marine fish species to viral hemorrhagic septicemia virus isolated from Japanese flounder. *Fish Pathology*, 38: 113–115
- Ito, T., Mori, K. I., Arimoto, M. ve Nakajima, K. 2004. Virulence of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) isolates from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in rainbow trout and several species of marine fish. *Fish Pathology*, 39: 103–104.
- Kalayci, G., Incoglu, S. ve Ozkan, B. 2006. First isolation of Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virüs from turbot (*Scophthalmus maximus*) cultured in the Trabzon coastal area of the Black Sea in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 26: 157-161.
- Mortensen, H. F., Heuer, O. E., Lorenzen, N., Otte, L. ve Olesen, N. J. 1999. Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. *Virus Research*, 63: 95–106.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 2373-2378.
- Schlottfeldt, H. J., Ahne, W., Vestergård-Jørgensen, P. E. ve Glende, W. 1991. Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*): a natural outbreak. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 11: 105–107.
- 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. *Diseases of Aquatic Organisms*, 66: 145-151.
- Skall, H. F., Olesen, N. J. ve Møllergaard, S. 2005b. Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming-a review. *Journal of Fish Diseases*, 28, 509-529.
- Snow, M., Bain, N., Black, J., Taupin, V., Cunningham, CO., King, J. A., Skall, H. F. ve Raynard, R. S. 2004. Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 61: 11–21.
- Takano, R., Nishizawa, T., Arimoto, M. ve Muroga, K. 2000. Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 20: 186–192.
- Winton, J. R., Batts, W. N., Nishizawa, T. ve Stehr, C. M. 1989. Characterization of the first North American isolates of viral hemorrhagic septicemia virus. *Newsletter of American Fisheries Society, Fish Health Section*, 17: 23.