

## Türkiye’de Çift Kabuklu Yumuşakçalarda Betanodavirus Varlığının Araştırılması

## Investigation of Betanodavirus Presence in Bivalve Mollusks in Türkiye

Murat Kaplan<sup>1,\*</sup>, Kemal Pekmez<sup>1</sup>, Abdurrahman Anıl Çağırğan<sup>1</sup>, Buket Özkan<sup>1</sup>, Fatih Arslan<sup>1</sup>,  
Bülent Kafa<sup>1</sup>, Gülnur Kalaycı<sup>1</sup><sup>1</sup> İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, Viroloji Bölümü, İzmir, Türkiye\*Sorumlu yazar: [kaplanmurat10@gmail.com](mailto:kaplanmurat10@gmail.com)

Geliş: 15.03.2022

Kabul: 18.04.2022

Yayın: 01.09.2022

**Alıntılama:** Kaplan, M., Pekmez, K., Çağırğan, A. A., Özkan, B., Arslan, F., Kafa, B., & Kalaycı, G. (2022). Türkiye’de çift kabuklu yumuşakçalarda Betanodavirus varlığının araştırılması. *Acta Aquatica Turcica*, 18(3), 415-425. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1088276>

**Özet:** Viral nervöz nekrozis (VNN), özellikle larva ve yavru deniz balıklarında, bazen de yetişkinlerde görülen önemli viral bir hastalıktır. Akdeniz’de artık levreklerde endemik olarak kabul edilen ve sık sık salgınlara neden olan betanodavirusların RGNNV genotipinin yanısıra, son birkaç yılda çipuralarda da salgınlar daha sık bildirilmeye başlanmış ve RGNNV/SJNNV genotipi izole edilmiştir. Bu çalışmanın amacı resmi otoriteden onaylı doğal yataklarda yetiştirilen akivades (*Ruditapes decussatus*) ve kara midye (*Mytilus galloprovincialis*) istasyonlarında VNN etkeni betanodavirus varlığının araştırılmasıdır. Çalışmada 2016-2020 yılları arasında beş adet akivades, sekiz adet kara midye istasyonundan toplam 50 örnekleme yapılmıştır. Akivades örnekleme Ağustos aylarında, kara midye örnekleme ise Eylül aylarında gerçekleştirilmiştir. Her örneklemede her istasyondan 30 adet örnek alınmıştır ve her biri beş örnekten oluşmak üzere toplam 300 adet havuz oluşturulmuştur. Çift kabuklu yumuşakçaların hepatopankreaslarından hazırlanan örnekler, Real-Time Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction (RT-qPCR) testi ile betanodavirus yönünden araştırılmıştır. RT-qPCR testleri sonucunda hem akivades örneklerinde hem kara midye örneklerinde betanodavirus nükleik asidi tespit edilmemiştir. Türkiye’de çift kabuklu yumuşakçalarda betanodavirus varlığı ilk defa bu çalışma ile araştırılmıştır. Sonuç olarak bu çalışma ile sadece doğal yataklarda bulunan midye ve akivadeslerde araştırma yapılmıştır, ancak, virüsün daha çok endemik olduğu Güney Ege ve Akdeniz bölgelerinde resmi onaylı akivades veya kara midye istasyonu bulunmadığından bu bölgelerde örnekleme yapılmamıştır. Kabuklularda betanodavirus epidemiyolojisini daha iyi anlamak için bu bölgeleri de içeren daha ileri ve genişletilmiş çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler**

- Akivades
- Betanodavirus
- Kara midye
- RT-qPCR

**Abstract:** Viral nervous necrosis (VNN) is an important viral disease that is seen especially in larval and juvenile, occasionally in adult marine fish. VNN is now accepted as endemic in the Mediterranean basin and outbreaks in sea bream caused by RGNNV/SJNNV genotype have been isolated as well as the RGNNV genotype of betanodaviridae which causes frequent outbreaks. The aim of this study was to investigate the presence of the betanodavirus in carpet shell (*Ruditapes decussatus*) and black mussel (*Mytilus galloprovincialis*) stations approved by the official authorities in Turkey. A total of 50 samplings were carried out from five carpet shells and eight black mussel stations between 2016-2020. Sampling of carpet shells were conducted in August and black mussels in September by every year. Thirty samples were collected from each station, and a total of three hundred pools consisting of five samples each were produced. Samples prepared from the hepatopancreas of the bivalve mollusks were tested by Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR). Betanodavirus

**Keywords**

- Black mussel
- Betanodavirus
- Carpet shell
- RT-qPCR



nucleic acid was not detected in any of carpet shell and black mussel samples. The presence of betanodavirus in bivalve mollusks in Turkey was investigated for the first time in this study. In conclusion, this study was conducted in only officially approved carpet shell and black mussel stations, however, since there were no officially approved stations in the Southern Aegean and Mediterranean regions, where the virus is more endemic, sampling was not conducted. Further and expanded studies are necessary including these regions to better understand the betanodavirus epidemiology in shellfish.

## 1. GİRİŞ

Viral Nervöz Nekrozis (VNN) hastalığı, *Nodaviridae* ailesi içinde yer alan betanodaviruslar tarafından meydana getirilen önemli viral bir hastalıktır. VNN, su ürünleri yetiştiriciliğinin sürdürülebilirliği ve gelişimi anlamında en büyük zordur ve üretime yönelik önemli bir risk oluşturduğu vurgulanmaktadır (Costa ve Thompson, 2016; Thiery vd., 2011; Toffan vd., 2017). En çok levrek, grouper ve yassı balıklarda görülmekle birlikte, başlıca deniz balıklarını etkilemektedir, bununla birlikte çipuralarda da VNN salgınları bildirilmiştir (Bitchava vd., 2007; Comps ve Raymond 1996; Munday vd., 2002; Sano vd., 2011; Toffan vd., 2017; Volpe vd., 2020).

Betanodaviruslar yaklaşık 25 nm çapında, ikosahedral yapıda, zarsız ve yuvarlak morfolojiye sahiptir (Breuil vd., 1991). Genomları, tek iplikçikli, pozitif polariteli ve iki segmentlidir (Johnson vd., 2003). RNA1 segmenti (3,1 kb), RNA bağımlı RNA polimerazın (RdRp) sentezinden sorumludur (Gallagher ve Rueckert, 1988; Nagai ve Nishizawa, 1999). RdRp, virus tarafından kodlanan tek enzimdir ve virusun sıcaklığa adaptasyonunda görev alır (Ahlquist vd., 2003; Hata vd., 2010; Panzarin vd., 2014). RNA1'in replikasyonu sırasında, RdRp tarafından subgenomik RNA3 transkripti üretimi yönlendirilir (Johnson vd., 2003). RNA2 segmenti, kapsid proteinini kodlar ve farklı genotiplerin konakçı tropizmi ve immunoreaktivitesinden sorumludur (Ito vd., 2008; Iwamoto vd., 2004; Johnson vd., 2003; Nishizawa vd., 1995; Panzarin vd., 2016). RNA3 olarak bilinen üçüncü transkript, viral replikasyon sürecinde RNA1 terminusundan ayrılır ve antinekrotik ölüm faktörü B1 (Cai vd., 2010; Fenner vd., 2006; Huang vd., 2001; Iwamoto vd., 2005) ve hücre RNA sessizleşmesinin inhibitörü B2 yapısal olmayan proteini kodlar (Fenner vd., 2006; Iwamoto vd., 2005; Nagai ve Nishizawa, 1999). RNA3, ayrıca virus RNA'sının konakçı hücrede toplanmasında görev alır.

Betanodaviruslar, RNA2 segmentinin T4 değişken bölgesinin filogenetik analizine göre resmi olarak *Striped jack nervous necrosis virus* (SJNNV), *Tiger puffer nervous necrosis virus* (TPNNV), *Barfin flounder nervous necrosis virus* (BFNNV) ve *Redspotted grouper nervous necrosis virus* (RGNNV) olarak dört major genotipte gruplandırılırlar (ICTV, 2021). Johansen vd. (2004), bir kalkandan (*Scophthalmus maximus*) izole ettikleri ve Turbot nodavirus (TNV) adını verdikleri yeni bir genotip önermişler, ancak henüz resmi olarak onaylanmamıştır. Genotipler türlere özgü olmaktan ziyade, optimum olarak geliştikleri bir su sıcaklığına ihtiyaç duyarlar (Costa ve Thompson, 2016). Virusun segmentli olmasından dolayı, reassortant oluşumu şimdiye kadar SJNNV ve RGNNV genotipleri arasında tespit edilmiştir ve levrek, çipura, dil balıklarında RGNNV/SJNNV veya SJNNV/RGNNV reassortantları pek çok kez rapor edilmiştir (Bitchava vd., 2019; He ve Teng, 2015; Toffan vd., 2017; Volpe vd., 2020).

Betanodaviruslar genel olarak Nervöz nekrozis virus (NNV) olarak ta anılmaktadırlar. NNV'ye en az 173 farklı kültürü yapılan veya yabani balık ve omurgasız türünün duyarlı olduğu ve bu türlerin en az 62'sinde salgın meydana getirdiği bildirilmektedir (Bandin ve Souto, 2020). VNN, genel olarak çiftlik balıklarında salgınlar meydana getirmektedir, ancak, başta orfoz olmak üzere yabani balıklarda da şiddetli salgınlar rapor edilmiştir (Gomez vd., 2009; Vendramin vd., 2013). Yabani balıklarda asemptomatik NNV enfeksiyonları da tespit edilmiştir (Baek vd., 2007; Barker vd., 2002; Ciulli vd., 2007; Gomez vd., 2004; Gomez vd., 2008a; Liu vd., 2015; Panzarin vd., 2012). Yumuşakçalarda NNV

varlığı Akdeniz, Güney Kore, Çin ve Japonya'da tespit edilmiştir (Ciulli vd., 2010; Fichi vd., 2015; Gomez vd., 2008b; Gomez vd., 2010; Gomez vd., 2006; Panzarin vd., 2012).

Çift kabuklu yumuşakçalar, diğer kabuklular gibi filtrasyon ile beslenen canlılardır ve çevrelerindeki sulara bulunan patojenleri yoğunlaştırabilirler (Metcalf vd., 1979; Rippey, 1994). Bu nedenle, çift kabuklu yumuşakçaların çeşitli patojenik virusların yayılmasında rol oynadıkları bildirilmiştir (Gomez vd., 2008b; Kim vd., 2016). Bu çalışmanın amacı, Kuzey Ege ve Marmara Deniz'lerinde yer alan ve resmi otoriteden onaylı doğal yataklarda yetiştirilen akivades ve kara midyelerde betanodavirus varlığının araştırılmasıdır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Örneklem

Kuzey Ege ve Marmara Deniz'lerinde yer alan ve resmi otoriteden onaylı doğal yataklarda bulunan akivades ve kara midye istasyonları, 2016-2020 yılları arasında örneklenmiştir. Örneklemeler Ağustos ve Eylül aylarında gerçekleştirilmiş olup, her bir istasyondan 30 adet akivades ve/veya kara midye alınmıştır (Tablo 2).

### 2.2. Örneklerin hazırlanması

Soğuk zincirde vakit geçirilmeden laboratuvara ulaştırılan kara midye ve akivades örneklerinden hepatopankreas alındıktan sonra 5 örnekten 1 havuz oluşturuldu. Steril havanda pens ve makas yardımıyla parçalara ayrıldıktan sonra steril kum (Sea sand, Merck, Germany, CAS-No: 14808-60-7) ile ezilerek, %2 FBS, %2 antibiyotik içeren EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) (Sigma-Aldrich, United Kingdom, Product No: M4655) vasatı ile 1/5 oranında homojenize edildi. Homojenizatlar 15 ml hacimdeki steril santrifüj tüplerine (Sarstedt, Germany, Ref: 62.554.502) aktarıldı, +4 °C ve 4000 g'de 15 dk santrifüj (ThermoFisher SL 16R, Germany) edildi ve elde edilen süpernatantlar 0,45 µm'lik membran filtreden (Sartorius, USA) geçirilerek inokulumlar hazırlandı ve vakit geçirilmeden moleküler testlere geçildi.

### 2.3. RNA ekstraksiyonu

Inokulumlardan 200'er µl alınarak 32 gözlü ekstraksiyon pleytlerine konuldu. RNA ekstraksiyonu ticari kitin protokülüne (MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, Roche, Germany, Product No. 03038505001) uygun olarak otomatik ekstraksiyon cihazında (MagNA Pure LC System, Roche, Germany) yapıldı. Ekstraksiyon işleminin doğrulanması ve olası çapraz kontaminasyonun tespit edilmesi amacıyla, ekstraksiyon işleminde pozitif kontrol ve negatif kontrol kullanıldı. Pozitif kontrol olarak referans betanodavirus, negatif kontrol olarak ise EMEM vasatı kullanıldı.

### 2.4. Real Time RT-PCR

Çalışmada, betanodavirusların RNA2 segmentinin T4 değişken bölgesine göre dizayn edilen Panzarin vd. (2010) tarafından geliştirilen primer ve prob kullanıldı (Tablo 1).

**Tablo 1.** Real Time RT-PCR testinde kullanılan primer ve prob dizilimleri

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

\*Reporter; FAM, quencher; BHQ1

Real Time RT-PCR (RT-qPCR) testinde ticari kit (Real Time Ready Virus Master, Roche, Germany, Cat. No. 05 992 877 01) ve Real Time PCR cihazı (Roche LightCycler® 480 Multiwell Plate 96) kullanıldı. Mastermiks, her bir örnek için 7,6 µl H<sub>2</sub>O, 1 µl F primer (10 µM), 1 µl R primer (10 µM), 1 µl Prob (10 µM), 4 µl 5x buffer, 0,4 µl enzim ile hazırlandı. Mastermiksten 96 gözlü Real Time PCR pleytlerine (Roche LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, White, Germany, Ref: 04 729 692 001) 15'er µl konulduktan sonra üzerlerine 5'er µl örnek RNA'sı, her pleyte pozitif ve negatif kontrol eklendi. Pleyt üzeri şeffaf bant ile kapatıldıktan sonra 1500g'de +4 °C'de 2 dk santrifüj edildi ve PCR cihazına yerleştirildi. Reaksiyon ve ısı koşulları ise reverse transkripsiyon için 53°C 4 dakika ve 50°C 6 dakika, reverse transkriptazın inhibisyonu için 95°C 65 saniye, ön denatürasyon 95°C 10 saniye, bağlanma ve sentez 54°C 30 saniye ve uzama 72°C 1 saniye 45 döngü olarak ayarlandı.

Çalışmada kullanılan RT-qPCR testi, saha örnekleri çalışılmadan önce optimize edildi. RT-qPCR testinin verimliliği: %98, duyarlılık: %100, özgüllük: %100, Slope değeri: -3.373,  $R^2$ : 0.98 ve minimum tespit limiti  $2.82 \times 10^1$  kopya/mL olarak hesaplandı. Pozitif kontrol olarak, RT-qPCR testi optimizasyonunda da kullanılan ve kopya sayısı bilinen plazmid DNA kullanıldı (Kaplan ve Karaoğlu, 2021).

### 3. BULGULAR

Çalışmaya ilk olarak 2016 yılında başlanmış ve tüm akivades ve kara midye örnekleri NNV yönünden negatif bulunmuştur. İlk örnekleme yılını takiben 2017, 2018, 2019 ve 2020 yıllarında da örnekleme devam edilmiş ve yine tüm örnekler NNV yönünden negatif bulunmuştur (Tablo 2).

**Tablo 2.** Örnekleme yapılan lokasyonlar ve yıllara göre test sonuçları

Kodu	Tür	Lokasyon	Örnekleme yılları ve test sonuçları				
			2016	2017	2018	2019	2020
A1	Akivades	İnciraltı - İzmir	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
A2	Akivades	Foça - İzmir	-*	Negatif	Negatif	-	-
A3	Akivades	Kalınburun - Erdek - Balıkesir	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
A4	Akivades	Hakimin Koyu - Erdek - Balıkesir	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
A5	Akivades	Bandırma - Balıkesir	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	-
M1	Kara Midye	Koyun Adası - Erdek - Balıkesir	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	-
M2	Kara Midye	Urla - İzmir	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	-
M3	Kara Midye	Aliğa - İzmir	Negatif	Negatif	-	Negatif	Negatif
M4	Kara Midye	İstanbul Boğazı	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
M5	Kara Midye	Balıkçı Adası-İstanbul	Negatif	Negatif	-	-	Negatif
M6	Kara Midye	Gelibolu - Çanakkale	-	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
M7	Kara Midye	Yenice - Bandırma - Balıkesir	-	-	Negatif	Negatif	-
M8	Kara Midye	Sarı Burun - Erdek - Balıkesir	-	-	Negatif	Negatif	Negatif

\*Üretim olmadığından örnekleme yapılmamıştır.

### 4. TARTIŞMA

VNN, Türkiye'de ilk defa 2011 yılında Akdeniz'de bir deniz işletmesinde klinik enfekte levreklerde tespit edilmiştir (Özkan Özyer vd., 2014). 2012 ve 2014 yıllarında ise kuluçkahane tarama çalışmaları sırasında asemptomatik yavru levrek ve çipuralardan NNV tespit edilmiştir. 2014 yılında ayrıca %5 ve %10 mortalite görülen bir kuluçkahane ve deniz işletmesinde fingerling levreklerde yine klinik olarak tespit edilmiştir (Kalaycı vd., 2016). NNV, ayrıca subklinik enfekte fingerling levreklerde 2016 ve 2017 yıllarında tespit edilmiştir, ilk tespiti takiben yapılan izleme çalışmalarında 2018 yılında yine aynı işletmede fingerling levreklerde tespit edilmiş, ancak fry ve daha küçük balıklarda tespit edilmemiştir. Fingerling boylarda tespit edilen virusun deniz suyu kaynaklı olabileceği değerlendirilmiştir (Kaplan ve Karaoğlu, 2021). Benzer şekilde 2016 yılında yapılan bir

tarama programında, Karadeniz’de subklinik enfekte levreklerde tespit edilmiştir, ancak ilk tespiti takiben yapılan izleme çalışmalarında virus tekrar tespit edilmemiştir (Kaplan vd., 2021). NNV, Türkiye’de son olarak 2019 yılında, 90-100 g ağırlığındaki çipuralarda subklinik olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada virus tespit edilen çiftlik ile ilişkili kuluçkahanelerde yapılan araştırmalarda, virus tekrar tespit edilmiş ve enfeksiyon kaynağı hem epidemiyolojik hem moleküler düzeyde ortaya konulmuştur (Kaplan vd., 2022). Hastalık ilk çıktığı 1985’ten bu yana, Güney Amerika hariç dünyanın pek çok bölgesinde bildirilmiştir (Costa ve Thompson, 2016). SJNNV genotipi, 2007 yılında İber Yarımadasında izole edilene kadar coğrafi olarak Japonya suları ile sınırlıyken (Cutrin vd., 2007), aynı yıl içerisinde Adriyatik Denizi’nde (Hırvatistan ve İtalya) Avrupa deniz levreğinden izole edilen reassortant betanodavirus (SJNNV/RGNNV) izolatları ilk defa tanımlanmıştır (Toffolo vd., 2007). Bunun çapraz reassortantı olan RGNNV/SJNNV genotipi ise günümüzde Güney Avrupa ve İber Yarımadasında çipura ve dil balıklarında yaygın olarak bulunmaktadır (Oliveira vd., 2009; Panzarin vd., 2012). VNN, Akdeniz havzasında endemiktir ve hastalığın ortaya çıkışı hem çiftlik hem de vahşi balıklarda çok kez ortaya konulmuştur ve bölgede endemik olarak seyretmektedir (Berzak vd., 2019; Costa ve Thompson, 2016; Munday vd., 2002; OIE, 2017; Toffan vd., 2017). RGNNV, bu bölgede en çok tespit edilen virus türüdür (Costa ve Thompson, 2016), ancak SJNNV türü de 2009 yılında İber Yarımadasında bildirilmiştir (Panzarin vd., 2012). Reassortant RGNNV/SJNNV ve SJNNV/RGNNV suşları sadece Akdeniz’de bildirilmiştir (He ve Teng, 2015). Türkiye’de levreklerde hem klinik hem subklinik olarak NNV tespit edilmesine rağmen çipuralarda şimdiye kadar sadece subklinik olarak tespit edilmiştir.

Yumuşakçaların akuatik virusların potansiyel bir rezervuarı olabileceği bildirilmiştir (Gomez vd., 2010; Panzarin vd., 2012). Yumuşakçalar betanodavirusların ayrıca doğal rezervuar ve muhtemel taşıyıcıları olarak işlev görürler. Betanodaviruslar, sağlıklı görünüşte yabancı ve çiftlik omurgasızlarından çift kabuklular (midye; *Mytilus galloprovincialis* ve istiridyeye; *Ruditapes philippinarum*), kabuklu (karides; *Pandalus hypsinotus*, yengeç; *Charybdis bimaculata*, dikenli istakoz; *Pamulirus versicolor* veya karındanbacaklı; *Opisthobranchia*) gibi yumuşakçalarda tespit edilmiştir (Gomez vd., 2008b; Gomez vd., 2008c).

Bu çalışmada, 2016, 2017, 2018, 2019 ve 2020 yıllarında kayıtlı istasyonlardan örneklenen, hem kara midyelerinde hem akivadeslerde NNV tespit edilmemiştir. NNV, Türkiye’nin Akdeniz ve Güney Ege kıyılarında levreklerde hem klinik hem subklinik olarak, çipuralarda ise subklinik olarak tespit edilmiştir (Kalaycı vd., 2016; Kaplan ve Karaoğlu, 2021; Kaplan vd., 2022; Özkan Özyer vd., 2014). Karadeniz’de tespit edilen NNV ise su kaynaklı olmayıp, daha önce enfekte olan, ancak virüsü persiste olarak taşıyan ve virus saçılımının olmadığı düşünülen levreklerde tespit edilmiştir (Kaplan vd., 2021). 5 yıllık tarama sonuçları dikkate alındığında, örneklenen bölgelerde virus sirkülasyonunun olmayabileceği sonucu çıkarılabilir.

NNV, şimdiye kadar 12 familya ve dokuz takıma ait 21 deniz omurgasız türünde tespit edilmiştir (Bandin ve Souto, 2020). Bu tespitlerin çoğu, filtre besleme aktiviteleri nedeniyle çevredeki sudan, viruslar da dahil olmak üzere farklı partiküller biriktirebilen çift kabuklu yumuşakçalarda gerçekleştirilmiştir (Ciulli vd., 2010; Gomez vd., 2008c, Panzarin vd., 2012). Akdeniz ülkeleri dışında Kore, Japonya ve Çin kıyılarında bulunan farklı kabuklu türlerinde de NNV tespit edilmiştir (Gomez vd., 2006; Gomez vd., 2008b; Kim vd., 2018). Berzak vd. (2019), tarafından Akdeniz’de İsrail kıyılarında toplanan 33 adet kum yengecinin 2’sinde NNV tespit edilmiştir. Ayrıca, Fransa’da pasifik midyesinde (*Cassostrea gigas*), İtalya’da istiridyede (*Ruditapes philippinarum*) (Gomez vd., 2008c) ve ahtapotta (*Octopus vulgaris*) (Fichi vd., 2015), Yunanistan’da Akdeniz midyesinde (*Mytilus galloprovincialis*), Avrupa istiridyesinde (*Ostrea edulis*) ve başka bir istiridyeye türünde (*Venus verrucosa*), ayrıca kırmızı ağızlı kabukluda (*Stramonita haemastoma*) (Bitchava vd., 2019) NNV tespit edilmiştir. Ayrıca, İtalya’da bir deniz kaplumbağasından (*Caretta caretta*) balık dışındaki bir deniz omurgasından ilk betanodavirus izolasyonu raporu edilmiş ve virusa karşı duyarlı konakçıların

yelpazesinin genişlediği bildirilmiştir (Fichi vd., 2016). Virus tespit edilen bu kabukluların hiçbirinde NNV'ye ilişkin klinik bir bulguya rastlanmamıştır (Bandin ve Souto, 2020). Omurgasızlar arasında en sık tespit edilen RGNNV genotipidir, ancak BFNNV genotipleri de Asya sularında tekli veya RGNNV genotipleri ile beraber tespit edilmiştir (Bandin ve Souto, 2020; Kim vd., 2018). Akdeniz'de tespit edilen virusların tamamı Akdeniz'de endemik olan RGNNV genotipidir. Bu da virusun endemik olduğu bölgelerde, çift kabukluların virusu filtrasyon sırasında alarak, horizontal olarak enfekte olduklarını ve virus replikasyonu olmasa bile rezervuar olduklarını göstermektedir.

## 5. SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışmada Ege ve Marmara Denizi'nde lokalize olan kayıtlı midye ve akivades istasyonlarında beş yıl boyunca NNV araştırması yapılmış ve tüm örnekler negatif bulunmuştur. İstasyonların konumları göz önüne alındığında, Akdeniz'de endemik olan ve Türkiye'de de daha önce tespit edilen RGNNV genotipi betanodavirusun optimum gelişme ısısından düşük ısıların bulunduğu ve daha önce virus tespit edilmeyen bölgelerde oldukları görülmektedir. Bu çalışma, sadece kayıtlı istasyonlarda gerçekleştirilmiştir ve özgünlük olarak değerlendirildiğinde, Türkiye'de çift kabuklu yumuşakçalarda NNV varlığı ilk kez araştırılmıştır. NNV'nin Türkiye kıyılarındaki kabuklulardaki varlığının daha iyi anlaşılması için, virusun optimum ısısına daha yakın olan ve virusun daha önce de tespit edildiği Güney Ege ve Akdeniz kıyılarını içeren, kayıtlı istasyon olmasa bile doğal hayatı kapsayan daha geniş tarama çalışmalarının yapılması gerektiği düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Yazarlar, desteklerinden ve teşviklerinden dolayı İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkür etmektedir.

## FİNANS KAYNAĞI

Bu çalışmanın yürütülmesinde herhangi bir finansal destek alınmamıştır.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar, bu çalışmayı etkileyebilecek finansal çıkarlar veya kişisel ilişkiler olmadığını beyan etmektedir.

## YAZAR KATKILARI

Çalışma kurgusu: MK, GK; Literatür taraması: MK; Metot çalışması: MK, KM; Laboratuvar çalışmaları: MK, KM, AAC, BÖ, FA, BK; Verilerin Analizi: MK; Makale yazımı: MK; Denetleme: MK, GK. Tüm yazarlar nihai taslağı onaylamıştır.

## ETİK ONAY BEYANI

Bu çalışmada deney hayvanları kullanılmaması nedeniyle Yerel Etik Kurul Onayı alınmamıştır.

## VERİ KULLANILABİLİRLİK BEYANI

Bu çalışmada kullanılan veriler bu makale içerisinde mevcuttur.

## KAYNAKLAR

Ahlquist, P., Noueir, A. O., Lee, W. M., Kushner, D. B., & Dye, B. T. (2003). Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *Journal of virology*, 77(15), 8181–86. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.15.8181-8186.2003>



- Baeck, G. W., Gomez, D. K., Oh, K. S., Kim, J. H., Choresca, C. H., & Park, S. C. (2007). Detection of piscine *Nodaviruses* from apparently healthy wild marine fish in Korea. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 27, 116–122.
- Bandín, I., & Souto, S., (2020). Betanodavirus and VER Disease: A 30-year Research Review. *Pathogens* 9, 106. <https://doi:10.3390/pathogens9020106>
- Barker, D. E., MacKinnon, A. M., Boston, L., Burt, M. D., Cone, D. K., Speare, D. J., Griffiths S, Cook M, Ritchie R, & Olivier, G. (2002). First report of piscine nodavirus infecting wild winter flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New Brunswick, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms*, 49(2), 99-105. <https://doi:10.3354/dao049099>
- Berzak, R., Scheinin, A., Davidovich, N., Regev, Y., Diga, R., Tchernov, D., & Morick, D. (2019). Prevalence of nervous necrosis virus (NNV) and Streptococcus species in wild marine fish and crustaceans from the Levantine Basin, Mediterranean Sea. *Diseases of Aquatic Organisms*, 133, 7-17. <https://doi.org/10.3354/dao03339>
- Bitchava, K., Xylouri, E., Fragkiadaki, E., Athanassopoulou, F., Sabatakou, O., & Papanastassopoulou, M. (2007). First incidence of clinical signs of nodavirus infection in sea bream, *Sparus auratus* L. *The Israeli Journal of Aquaculture*, 59, 3–9.
- Bitchava, K., Chassalevris, T., Lampou, E., Athanassopoulou, F., Economou, V., & Dovas, C. I. (2019). Occurrence and molecular characterization of betanodaviruses in fish and invertebrates of the Greek territorial waters. *Journal of Fish Diseases*, 42(12), 1773-1783. <https://doi.org/10.1111/jfd.13098>
- Breuil, G., Bonami, J. R., Pepin, J. F., & Pichot, Y. (1991). Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 97(2-3), 109-116. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90258-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90258-9)
- Cai, D., Qiu, Y., Qi, N., Yan, R., Lin, M., Nie, D., Zhang, J., & Hu, Y. (2010). Characterization of Wuhan Nodavirus subgenomic RNA3 and the RNAi inhibition property of its encoded protein B2. *Virus Research*, 151(2), 153-161. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.04.010>
- Ciulli, S., Galletti, E., Grodzki, M., Alessi, A., Battilani, M., & Prospero, S. (2007). Isolation and genetic characterization of Betanodavirus from wild marine fish from the Adriatic Sea. *Veterinary Research Communications*, 31(Suppl 1), 221–224. <https://doi.org/10.1007/s11259-007-0010-y>
- Ciulli, S., Grodzki, M., Bignami, G., Serratore, P., & Prospero, S. (2010). Molecular detection and genetic analysis of Betanodaviruses in bivalve mollusks. *Journal of Biotechnology*, 150, S4. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.08.026>
- Comps, M., & Raymond, J.C. (1996). Virus-like particles in the retina of the sea bream, *Sparus aurata*. *Bulletin of The European Association of Fish Pathologists*, 16(5), 161–63.
- Costa, J.Z., & Thompson, K.D. (2016). Understanding the interaction between Betanodavirus and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy. *Fish and Shellfish Immunology*, 53, 35–49. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.033>
- Cutrín, J. M., Dopazo, C. P., Thiery, R., Leao, P., Oliveira, J. G., Barja, J. L., & Bandin, I. (2007). Emergence of pathogenic betanodaviruses belonging to the SJNNV genogroup in farmed fish species from the Iberian Peninsula. *Journal of Fish Diseases*, 30(4), 225–32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00803.x>
- Fenner, B. J., Goh, W., & Kwang, J. (2006). Sequestration and protection of double-stranded RNA by the Betanodavirus B2 Protein. *Journal of Virology*, 80(14), 6822–33. <https://doi.org/10.1128/JVI.00079-06>
- Fichi, G., Cardeti, G., Perrucci, S., Vanni, A., Cersini, A., Lenzi, C., De Wolf, T., Fronte, B., Guarducci, M., & Susini, F. (2015). Skin lesion-associated pathogens from *Octopus vulgaris*:

- first detection of *Photobacterium swingsii*, *Lactococcus garvieae* and betanodavirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 115(2), 147-156. <https://doi.org/10.3354/dao02877>
- Fichi, G., Cardeti, G., Cersini, A., Mancusi, C., Guarducci, M., Di Guardo, G., & Terracciano, G. (2016). Bacterial and viral pathogens detected in sea turtles stranded along the coast of Tuscany, Italy. *Veterinary Microbiology*, 185, 56-61. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.02.003>
- Gallagher, T. M., & Rueckert, R. R. (1988). Assembly-dependent maturation cleavage in provirions of a small icosahedral insect ribovirus. *Journal of Virology*, 62(9), 3399-3406. <https://doi.org/10.1128/jvi.62.9.3399-3406.1988>
- Gomez, D. K., Sato, J., Mushiake, K., Isshiki, T., Okinaka, Y., & Nakai, T. (2004). PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *Journal of Fish Diseases*, 27, 603–608. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00577.x>
- Gomez, D. K., Lim, D. J., Baeck, G. W., Youn, H. J., Shin, N. S., Youn, H. Y., Hwang, C. Y., & Park, S. C. (2006). Detection of betanodaviruses in apparently healthy aquarium fishes and invertebrates. *Journal of Veterinary Science*, 7(4), 369-374. <https://doi.org/10.4142/jvs.2006.7.4.369>
- Gomez, D. K., Baeck, G. W., Kim, J. H., Choresca, C. H. Jr, & Park, S. C. (2008a). Molecular detection of Betanodavirus in wild marine fish populations in Korea. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20, 38–44. <https://doi.org/10.1177/104063870802000107>
- Gomez, D. K., Baeck, G. W., Kim, J. H., Choresca Jr, C. H., & Park, S. C. (2008b). Molecular detection of betanodaviruses from apparently healthy wild marine invertebrates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97(3), 197-202. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.10.012>
- Gomez, D. K., Baeck, G. W., Kim, J. H., Choresca, C. H. Jr, & Park, S. C. (2008c). Genetic analysis of betanodaviruses in subclinically infected aquarium fish and invertebrates. *Current Microbiology*, 56, 499–504. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9116-x>
- Gomez, D. K., Matsuoka, S., Mori, K., Okinaka, Y., Park, S. C., & Nakai, T. (2009). Genetic analysis and pathogenicity of Betanodavirus isolated from wild redspotted grouper *Epinephelus akaara* with clinical signs. *Archives of Virology*, 154, 343–346. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0305-5>
- Gomez, D. K., Mori, K., Okinaka, Y., Nakai, T., & Park, S. C. (2010). Trash fish can be a source of betanodaviruses for cultured marine fish. *Aquaculture*, 302, 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.033>
- Hata, N., Okinaka, Y., Iwamoto, T., Kawato, Y., Mori, K.-I., & Nakai, T. (2010). Identification of RNA regions that determine temperature sensitivities in *betanodaviruses*. *Archives of Virology*, 155, 1597–606. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0736-7>
- He, M., Teng, C.B. (2015). Divergence and codon usage bias of Betanodavirus, a neurotropic pathogen in fish. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 83, 137–42. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.11.016>
- Huang, B., Tan, C., Chang, S. F., Munday, B. L., Mathew, J. A., Ngoh, G. H., & Kwang, J. (2001). Detection of nodavirus in barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), using recombinant coat protein-based ELISA and RT-PCR. *Journal of Fish Diseases*, 24(3), 135-141. <https://doi:10.1046/j.1365-2761.2001.00270.x>
- Johansen, R., Rove, S., Svendsen, A. K., Modahl, I., & Dannevig, B. (2004). A sequential study of pathological findings in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L), throughout one year after an acute outbreak of viral encephalopathy and retinopathy. *Journal of Fish Diseases*, 27 (6), 327–341. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00548.x>
- Johnson, K. L., Price, B. D., & Ball, L. A. (2003). Recovery of infectivity from cDNA clones of nodamura virus and identification of small nonstructural proteins. *Virology*, 305(2), 436-451. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1769>



- ICTV (2021). International Committee on Taxonomy of Viruses. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>  
Erişim: 11 Aralık 2021
- Ito, Y., Okinaka, Y., Mori, K. I., Sugaya, T., Nishioka, T., Oka, M., & Nakai, T. (2008). Variable region of betanodavirus RNA2 is sufficient to determine host specificity. *Diseases of Aquatic Organisms*, 79(3), 199-205. <https://doi.org/10.3354/dao01906>
- Iwamoto, T., Okinaka, Y., Mise, K., Mori, K. I., Arimoto, M., Okuno, T., & Nakai, T. (2004). Identification of host-specificity determinants in betanodaviruses by using reassortants between striped jack nervous necrosis virus and sevenband grouper nervous necrosis virus. *Journal of Virology*, 78(3), 1256-1262. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.3.1256-1262.2004>
- Iwamoto, T., Mise, K., Takeda, A., Okinaka, Y., Mori, K., Arimoto, M., Okuno, T., & Nakai, T. (2005). Characterization of striped jack nervous necrosis virus subgenomic RNA3 and biological activities of its encoded protein B2. *Journal of General Virology*, 86, 2807-16. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80902-0>
- Kalaycı, G., Özkan, B., Pekmez, K., & Kaplan, M. (2016, Ağustos 30 – Eylül 2). Levrek ve çipura kuluçkahanelerinde viral nervöz nekrozis hastalığının durumu (Poster sunum). XII. Veterinary Medicines Microbiology Congress with International Attendance, Kapadokya/Nevşehir.
- Kaplan, M., & Karaoğlu, M. T. (2021). Investigation of betanodavirus in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at all production stages in all hatcheries and on selected farms in Turkey. *Archives of Virology*, 166, 3343-3356. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05254-0>
- Kaplan, M., Pekmez, K., Özkan, B., Çağırman, A. A., & Kalaycı, G. (2021). Detection of RGNNV genotype betanodavirus in the Black Sea and monitoring studies. *Diseases of Aquatic Organisms*, 144, 117-121. <https://doi.org/10.3354/dao03583>
- Kaplan, M., Pekmez, K., Çağırman, A. A., Arslan, F., Özkan, B., & Kalaycı, G. (2022). The first detection of betanodavirus reassortant genotype (RGNNV/SJNNV) isolated from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in the Turkish coastlines: The importance of screening and monitoring studies for identifying the source of the infection. *Journal of Fish Diseases*, 45(6), 783-793. <https://doi.org/10.1111/jfd.13603>
- Kim, K. I., Kwon, W. J., Kim, Y. C., Kim, M. S., Hong, S., & Jeong, H. D. (2016). Surveillance of aquatic animal viruses in seawater and shellfish in Korea. *Aquaculture*, 461, 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.053>
- Kim, Y. C., Kwon, W. J., Kim, M. S., Kim, K. I., Min, J. G., & Jeong, H. D. (2018). High prevalence of betanodavirus barfin flounder nervous necrosis virus as well as red-spotted grouper nervous necrosis virus genotype in shellfish. *Journal of Fish Diseases*, 41(2), 233-246. <https://doi.org/10.1111/jfd.12702>
- Liu, X. D., Huang, J. N., Weng, S. P., Hu, X. Q., Chen, W. J., Qin, Z. D., Dong, X. X., Liu, X. L., Zhou, Y., Asim, M., vd. (2015). Infections of nervous necrosis virus in wild and cage-reared marine fish from South China Sea with unexpected wide host ranges. *Journal of Fish Diseases*, 38(6), 533-540. <https://doi.org/10.1111/jfd.12265>
- Metcalf, T. G., Mullin, B., Eckerson, D., Moulton, E., & Larkin, E. P. (1979). Bioaccumulation and depuration of enteroviruses by the softshelled clam, *Mya arenaria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 38, 275-282. <https://doi.org/10.1128/aem.38.2.275-282.1979>
- Munday, B. L., Kwang, J., & Moody, N. (2002). Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *Journal of Fish Diseases*, 25(3), 127-142. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00350.x>
- Nagai, T., & Nishizawa, T. (1999). Sequence of the non-structural protein gene encoded by RNA1 of striped jack nervous necrosis virus. *Journal of General Virology*, 80(11), 3019-3022. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-11-3019>
- Nishizawa, T., Mori, K. I., Furuhashi, M., Nakai, T., Furusawa, I., & Muroga, K. (1995). Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis

- in marine fish. *Journal of General Virology*, 76(7), 1563-1569. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-7-1563>
- Olveira, J. G., Souto, S., Dopazo, C. P., Thiéry, R., Barja, J. L., & Bandín, I. (2009). Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. *Journal of General Virology*, 90(12), 2940-2951. <https://doi.org/10.1099/vir.0.013912-0>
- OIE, (2017). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Section 2.3. Diseases of Fish. Chapter 2.3.12 Viral encephalopathy and retinopathy [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/aahm/current/chapitre\\_viral\\_encephalopathy\\_retinopathy.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_viral_encephalopathy_retinopathy.pdf). Erişim: 10 Aralık 2021.
- Özkan Özyer, B., Kalaycı, G., İnçoğlu, Ş., Pekmez, K., & Küçükali, Y. (2014). Türkiye’de kültürü yapılan levreklerden betanodavirus’un ilk izolasyonu. *Bornova Veteriner Bilimler Dergisi*, 36 (50), 13-17.
- Panzarin, V., Patarnello, P., Mori, A., Rampazzo, E., Cappelozza, E., Bovo, G., Cattoli, G. (2010). Development and validation of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens. *Archives of Virology*, 155, 1193–1203. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0701-5>
- Panzarin, V., Fusaro, A., Monne, I., Cappelozza, E., Patarnello, P., Bovo, G., Capua, I., Holmes, E. C., & Cattoli, G. (2012). Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(1), 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.10.007>
- Panzarin, V., Cappelozza, E., Mancin, M., Milani, A., Toffan, A., Terregino, C., & Cattoli, G. (2014). In vitro study of the replication capacity of the RGNNV and the SJNNV betanodavirus genotypes and their natural reassortants in response to temperature. *Veterinary research*, 45(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-56>
- Panzarin, V., Toffan, A., Abbadi, M., Buratin, A., Mancin, M., Braaen, S., Olsen, C.M., Bargelloni, L., Rimstad, E., & Cattoli, G. (2016). Molecular basis for antigenic diversity of genus Betanodavirus. *PloS one*, 11(7), e0158814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158814>
- Rippey, S. R. (1994). Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 419–425. <https://doi.org/10.1128/CMR.7.4.419>
- Sano, M., Nakai, T., & Fijan, N. (2011). Viral diseases and agents of warmwater fish. In: *Fish Diseases and Disorders, Vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, 2nd edition*, Woo P.T.K & Bruno D.W., (pp. 166–244) eds. CABI.
- Thiéry, R., Johnson, K.L., Nakai, T., Schneemann, A., Bonami, J.R., Lightner, D.Y. (2011). Family Nodaviridae. In: *Virus Taxonomy Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B. and Lefkowitz E.J., (pp. 1061–1067). eds. Elsevier Academic Press.
- Toffan, A., Pascoli, F., Pretto, T., Panzarin, V., Abbadi, M., Buratin, A., Quartesan, R., Gijón, D., & Padrós, F. (2017). Viral nervous necrosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) caused by reassortant betanodavirus RGNNV/SJNNV: an emerging threat for Mediterranean aquaculture. *Scientific Reports*, 7(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep46755>
- Toffolo, V., Negrisolo, E., Maltese, C., Bovo, G., Belvedere, P., Colombo, L., & Dalla Valle, L. (2007). Phylogeny of betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(1), 298-308. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.08.003>
- Vendramin, N., Patarnello, P., Toffan, A., Panzarin, V., Cappelozza, E., Tedesco, P., & Cattoli, G. (2013). Viral Encephalopathy and Retinopathy in groupers (*Epinephelus* spp.) in southern Italy:

- A threat for wild endangered species. *BMC Veterinary Research*, 9, 20. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-20>
- Volpe, E., Grodzki, M., Panzarin, V., Guercio, A., Purpari, G., Serratore, P., & Ciulli, S. (2018). Detection and molecular characterization of betanodaviruses retrieved from bivalve molluscs. *Journal of Fish Diseases*, 41(4), 603-611. <https://doi.org/10.1111/jfd.12759>
- Volpe, E., Gustinelli, A., Caffara, M., Errani, F., Quaglio, F., Fioravanti, M. L., & Ciulli, S. (2020). Viral nervous necrosis outbreaks caused by the RGNNV/SJNNV reassortant betanodavirus in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 523, 735155. <https://doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735155>