

Türkiye’de Kültürü Yapılan Gökkuşuğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis Virus Varlığının Tespiti Üzerine Bir Araştırma ^[1]

Metin GÜRÇAY *  Turhan TURAN * Ayşe PARMAKSIZ *

[1] Bu çalışma Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (Proje no: TAGEM/HS/11/09/02/189) tarafından desteklenmiştir

* Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Veteriner Kontrol Enstitüsü, Viroloji Laboratuvarı TR-23200 Elazığ - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2012-7396

Özet

Bu çalışmada, Türkiye’nin farklı bölgelerindeki gökkuşuğu alabalık çiftliklerinde infeksiyöz pankreatik nekroz virusunun (IPNV) varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla, Aralık 2010 ile Mart 2011 tarihleri arasında, 30 alabalık çiftliğindeki anaçlardan 47 seminal sıvı, 62 ovarial sıvı alınmış ve 134 yavru alabalıktan oluşan toplam 243 izolasyon materyali temin edilmiştir. Virus izolasyonu için izolasyon materyallerinin BF-2 (Bluegill fry-2) hücrelerinde iki pasajı yapılmıştır. Sitopatik efekt (SPE) gösteren hücre kültür süpernatantları, IPNV identifikasyonu için antijen enzime linked immunosorbent assay (Ag-ELISA) metodu ile analize tabi tutulmuştur. Bütün izolasyon materyallerine, hücre kültürü izolasyonu testiyle karşılaştırmak amacıyla Ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) testi de uygulanmıştır. Toplam 243 izolasyon materyalinin 26’sından (%10.7) IPNV izole edilmiştir. İzolasyon materyali alınan 11 ilin 7’sinde (%63.6) ve toplam 30 çiftliğin 17’sinde (%56.6) IPNV varlığı tespit edildi. Ayrıca, virus izolasyon yöntemine göre daha ucuz ve daha hızlı bir metot olan RT-PZR testinin, IPNV’nun direkt dokudan tanısında alternatif bir metot olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: İnfeksiyöz pankreatik nekroz virüsü (IPNV), Gökkuşuğu alabalığı, Virus izolasyonu, RT-PZR, ELISA

A Study on the Presence of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Infections in Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) in Turkey

Summary

In this study, the presence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) was investigated in farmed rainbow trout in different regions of Turkey. For this purpose, total of 243 isolation materials (47 seminal fluids, 62 ovarian fluids and 134 fingerling) were collected from 30 farms in the period of December and March 2010-2011. Isolation materials were passaged twice in BF-2 (Bluegill fry-2) cell cultures for virus isolation. The cell culture supernatants showed cytopathic effect (CPE) were tested by antigen-capture enzyme linked immunosorbent assay (Ag-ELISA) for IPNV identification. All isolation materials were tested also by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in order to compare with the test of the virus isolation. IPNV was detected from 26 (10.7%) of total 243 isolation materials obtained from 17 (56.6%) of 30 farms in 7 (63.6%) of 11 provinces. In addition, that RT-PCR test can be used as an alternative method in the IPNV-diagnosis by directly tissue-testing due to less expensive and faster than the virus isolation method was determined.

Keywords: Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV), Rainbow Trout, Virus isolation, RT-PCR, ELISA

GİRİŞ

Son yıllarda Türkiye’de kültür balıkçılığı hızlı bir gelişme göstermektedir. İstatistik rakamlarına göre, Türkiye’deki iç

su alabalık üretimi, toplam balık üretiminin %46’sını oluşturmaktadır. İç su alabalık üretiminin yaklaşık %17’si ise, Doğu



İletişim (Correspondence)



+90 424 2181834



mgurcay2000@yahoo.com

ve İç Anadolu bölgelerinde yapılmaktadır ¹.

İnfeksiyöz pankreatik nekrozis virusu (IPNV), *Birnaviridae* familyasında *Aquabirnavirus* genusunda yer almakta olup, ortalama 60 nm çapında, ikosahedral simetrik, zarfsız, iki segmentli ve çift iplikçikli RNA’ya sahiptir ^{2,3}. Virus, değişik balık türlerinde pankreas nekrozu ile karakterize olan bulaşıcı ve sistemik bir hastalık oluşturmaktadır. Hastalık, özellikle yavru ve genç salmonid balıklarda yüksek mortalite ile seyretmektedir ². İnfeksiyöz pankreatik nekrozis virüs (IPNV) enfeksiyonu, klinik veya subklinik enfeksiyon şeklinde görülmektedir. Her iki durumunda enfeksiyonu atlatıp sağ kalan balıklar, hayat boyu enfeksiyonu taşıyıcı olarak kalmaktadır ³. Enfeksiyonun ortaya çıkmasında suyun sıcaklığı, oldukça önemli bir etkidir. Enfeksiyon, genellikle suyun sıcaklığının 12°C’nin altına düştüğü zamanlarda ortaya çıkmaktadır ⁴. IPNV’nin teşhisinde virus izolasyonu, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ve moleküler teknikler gibi pek çok metot kullanılmaktadır ^{5,6}.

Üretimi yapılan balıklarda IPNV ’nin varlığı, dünyanın birçok ülkesinde ⁷⁻¹⁰ olduğu gibi Türkiye’de de bildirilmiştir ^{4,11-14}. Değirmenci ve ark. ¹² tarafından, 2003-2008 yılları arasında Ege, Marmara, İç ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinden, enfeksiyonun salgın halde görüldüğü işletmelerden alınan hasta yavru gökkuşuğu alabalık örneklerinin virolojik muayenesi sonucunda toplam 21 IPNV suşu izole edilmiştir. Toplu ve ark. ¹³, bir alabalık işletmesinde iştahsızlık ve yüzme bozukluğu gösteren balıkların nekropsisinde herhangi bir belirtiyi rastlamamalarına rağmen, RT-PZR ile IPNV varlığını tespit etmişlerdir. Tatlı sulardaki gökkuşuğu alabalıklarında IPNV izolasyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada ¹⁴ ise, Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi’ndeki alabalığı çiftliklerinden temin edilen yavru ve porsiyon (3-500 g) balıkları analize tabi tutulmuş ve IPNV izole edilmiştir.

IPNV enfeksiyonu, ortaya çıktığı alabalık işletmelerinde büyük ekonomik kayıplara yol açtığı gibi, aynı zamanda uluslararası ticarete de bazı kısıtlamaların uygulanmasına

neden olmaktadır. Bu konuda OIE ve Avrupa Birliği direktifleri ile Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından hazırlanan Hayvan Hastalıkları ile Mücadele ve Hayvan Hareketleri Kontrolü genelgesinde ihbarı mecburi balık hastalıkları ve IPNV enfeksiyonlarına duyarlı türler arasında *Oncorhynchus mykiss*’ in olduğu belirtilmiş ve hastalıklarla mücadele ve kontrol altına alınmasında belirleyici kurallar konulmuştur ¹⁵.

Yapılan literatür taramasında, bugüne kadar Türkiye’de gökkuşuğu alabalık çiftliklerinde IPNV enfeksiyonunun varlığı ve yaygınlığını vaka bazında veya bölgesel olarak araştıran çalışmalar ^{4,11-14} yapılmış, izolasyon materyali olarak da sadece balıklar kullanılmıştır. Ancak, farklı bölgeleri ele alarak Türkiye’deki genel durumu ortaya koyan, aynı zamanda yavru alabalıkların yanında, anaç balıklara ait seminal ve ovarial sıvıların izolasyon materyali olarak kullanıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada, bir taraftan Türkiye’nin farklı bölgelerinde bulunan gökkuşuğu alabalık çiftliklerindeki IPNV enfeksiyonunun varlığının ve yaygınlığının araştırılması, diğer taraftan da izolasyon materyali olarak yavru alabalıkların yanı sıra, anaç alabalıklara ait seminal ve ovarial sıvılarının kullanılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Yavru Alabalık, Alabalık Seminal ve Ovarial Sıvılar

Çalışmada kullanılan yavru alabalık, anaç alabalığı seminal ve ovarial sıvıları, Doğu, Güneydoğu, Akdeniz ve İç Anadolu bölgelerinde bulunan toplam 11 ilde (Elazığ, Malatya, Sivas, Muş, Bitlis, Erzincan, Tunceli, Şanlıurfa, Kahramanmaraş, Erzurum, Mardin) tatlı su kaynakları üzerinde kurulmuş toplam 30 gökkuşuğu alabalık çiftliğinden temin edilmiştir. Bu çiftliklerden, izolasyon materyali elde etmek amacıyla, su sıcaklığının 12°C’nin altına düştüğü Aralık 2010 - Mart 2011 döneminde 670 yavru alabalık (1-5 g), 235 seminal sıvı ve 310 ovarial sıvıdan oluşan toplam 1215 numune alınmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Gökkuşuğu alabalık çiftliklerinden alınan izolasyon materyallerinin illere göre dağılımı

Table 1. Distribution of the isolation materials obtained from the rainbow trout farms according to the provinces

| İller | İşletme Sayısı | İzolasyon Materyallerinin Sayıları | | | Toplam İzolasyon Materyali |
|---------------|----------------|------------------------------------|--------------|--------------|----------------------------|
| | | Yavru Alabalık | Seminal Sıvı | Ovarial Sıvı | |
| Elazığ | 4 | 24 | 6 | 8 | 38 |
| Malatya | 4 | 37 | 6 | 9 | 52 |
| Sivas | 6 | 44 | 10 | 11 | 65 |
| Muş | 1 | - | 2 | 4 | 6 |
| Bitlis | 2 | - | 3 | 6 | 9 |
| Erzincan | 2 | 4 | 4 | 6 | 14 |
| Tunceli | 1 | 2 | 2 | 4 | 8 |
| Şanlıurfa | 2 | 4 | 3 | - | 7 |
| Kahramanmaraş | 3 | 7 | 5 | 7 | 19 |
| Erzurum | 4 | 9 | 6 | 7 | 22 |
| Mardin | 1 | 3 | - | - | 3 |
| Toplam | 30 | 134 | 47 | 62 | 243 |

İzolasyon Materyalleri

Yavru balıkların kuyrukları kesildikten sonra tüm balık izolasyon materyali olarak kullanılmıştır. Bu yavru balıklardan 5'er adedi ile birer izolasyon havuzu oluşturulmuştur. Aynı şekilde alabalık işletmelerine ait anaç balıklardan alınan seminal ve ovarial sıvıların 5'er adedi ile de izolasyon havuzları oluşturulmuş, böylece 134 yavru alabalık izolasyon materyali, 47 seminal sıvı izolasyon materyali ve 62 ovarial sıvı izolasyon materyalinden oluşan toplam 243 izolasyon materyali elde edilmiştir (Tablo 1). Bu doku materyalleri antibiyotikli PBS içinde 4°C'de parçalayıcı yardımıyla homojenize (MagNa Lyser (Roche, Mannheim, Germany) edildikten sonra 3.000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar, 0.45 µm çaplı enjektör filtreden geçirilmiştir. Ayrıca, süpernatantlardan sterilite kontrolü için de örnekler alınmıştır. Örnekler, daha sonra hücre kültürü inokulasyonu ve RT-PZR aşamalarında kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Hücre ve Virus

Materyallerin izolasyonunda kullanılan BF-2 (Bluegill fry-2) doku kültürü hücreleri ve kontrol virusları ulusal referans laboratuvar olan Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Hücre ve virus üretiminde %1 Penisilin (10.000 U/ml) - Streptomisin (10 mg/ml) - Amfoterisin B (0.025 mg/ml) solüsyonu ve 1 M Hepses içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ile %10 fetal dana serumu kullanılmıştır.

Virus İzolasyonu

BF-2 hücreleriyle kaplanmış 24 kuyucuklu makropleytlere izolasyon materyallerinin 1/10 ve 1/100'lik dilüsyonları 100 µl hacimde inoküle ederek %5 CO₂'li etüvde 15°C'de 7 gün boyunca sitopatik efekt (SPE) ^{5,16} yönünden her gün kontrol edilmiştir. IPNV-pozitif olan materyaller hücre kültüründe 24 saat içerisinde çekirdek piknozislerine ve gözle görülebilen küçük plakların oluşmasıyla karakterize sitopatik efektlere rastlanmıştır. Total hücre yıkımı 2-3 gün sonra gerçekleşmiştir. Hücre kültüründe SPE meydana gelen kuyucuklardan elde edilen süpernatantlara dondur-çöz yapıp 3.000 rpm'de 10 dk süreyle santrifüj edildikten sonra virusun idenfikasyonu yapılmak üzere -80°C'de stoklanmıştır. SPE oluşturmeyen materyallerin bulunduğu makropleytlere ise 7 gün boyunca doku kültürü mikroskopunda (Nikon ECLIPSE TS 100) kontrol edilmiş ve BF-2 hücresinde en az iki pasajı yapılmıştır.

Ag-ELİSA

Hücre kültürü ekimlerinde SPE oluşturan izolatların, im-

münolojik identifikasyonu antijen enzyme linked immunosorbent assay (Ag-ELİSA) (BIO K 282 IPNV ELISA test kit, Bio X Diagnostics S.P.R.L. Belgium) testi ile üretici firmanın önerdiği prosedüre göre yapılmıştır. Test pleytleri, ELİSA okuyucuda 450 nm filtre absorbans değerlerinde okunarak sonuçlar hesaplanmıştır ^{5,7}.

RNA Ekstraksiyonu ve Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Anaç balıklara ait ovarial-seminal sıvılar ve yavru balıkların organ homojenatlarından elde edilen izolasyon materyalleri RT-PZR testine tabi tutulmuştur ^{5,6}. Virüs RNA'sı ekstraksiyonu, tek adım reçine-tabanlı ekstraksiyon kitleri (RNAeasy Mini Kit, Qiagen) ile yapılmıştır (Tablo 2) ¹⁷. Test kiti içine RNA ekstraktı katılmadan önce 2 µl ekstrakte edilmiş RNA 1 µl deiyonize formamide ile karıştırılarak 100°C'de 40 sn bırakılarak denatürasyonu sağlandı. RT-PZR işlemi, Qiagen one-step RT-PCR kit ile üretici firmanın prosedürüne göre ¹⁸ gerçekleştirilmiştir. Kısaca, toplam hacim 50 µl olacak şekilde 10.0 µl buffer, 2.0 µl dNTP mix, 2.0 µl enzyme mix, 10.0 µl 5x Q-Solution ve primerlerden ¹⁹ (Tablo 2) oluşan ana karışıma kalıp RNA ilave edilerek elde edilen karışım, 55°C'de 30 dk., 94°C'de 2 dk, daha sonra 45 siklus 94°C'de 45 sn, 45°C'de 45 dk, 68°C'de 2 dk ve sonunda 68°C'de 7 dk bir siklus olacak şekilde programlanarak thermal cycler'a konulmuştur. Amplifiye olmuş DNA (206 bp) agaroz jelde tespit edilmiştir.

BULGULAR

Virus İzolasyonu

Türkiye'nin Doğu, Güneydoğu, Akdeniz ve İç Anadolu bölgelerinde bulunan 11 ildeki toplam 30 gökkuşağı alabalık çiftliğinden elde edilen ve bu çalışmada kullanılan 47 seminal sıvı izolasyon materyalinin sadece birinde (%2.12), 62 ovarial sıvısı izolasyon materyalinin 6'sında (%9.67) ve 134 yavru alabalık izolasyon materyalinin 19'unda (%14.17) virus bulunduğu saptanmıştır. Daha sonra uygulanan Ag-ELİSA testleri sonucunda, bu viruslar IPNV olarak tanımlanmıştır (Tablo 3). Toplam 243 izolasyon materyalinin 26'sında (%10.69) IPNV izolasyonu sağlanmıştır. Bu sonuçlara göre virus izolasyon materyallerinin temin edildiği 11 ilden 7'sinde (Elazığ, Malatya, Sivas, Erzincan, Şanlıurfa, Kahramanmaraş ve Erzurum) (%63.6) bulunan toplam 17 alabalık çiftliğinde (% 56.6) IPNV izole edilmiştir.

Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Alabalık çiftliklerinden alınan izolasyon materyallerine, hücre kültürü izolasyonu testiyle karşılaştırmak amacıyla Ters

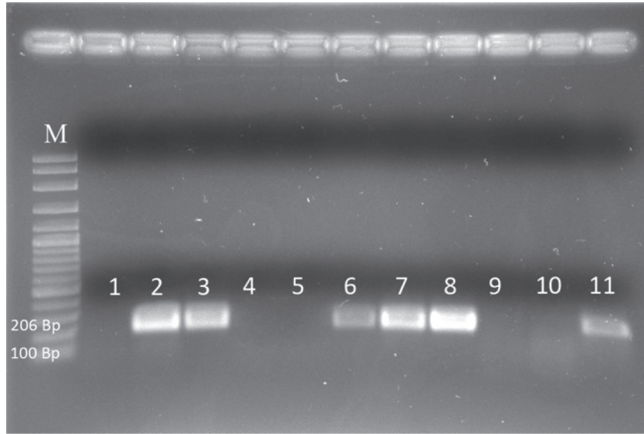
Tablo 2. IPNV izolasyonunda uygulanan RT-PCR'da kullanılan primerlerin özellikleri

Table 2. Characteristics of the primers used in RT-PCR applied to the IPNV isolation

| Primer (5' 3') | Proteini Kodlayan Gen | Ürün Büyüklüğü | Referans |
|---------------------------------|-----------------------|----------------|----------|
| WB1, CGCAACTTACTTGAGATCCATTATGC | VP2 | 206 (bp) | 19 |
| WB2, GTCTGGTTCAGATTCCACCTGTAGTG | | | |

Tablo 3. İzolasyon materyallerinin ve IPNV-pozitif izolasyon materyallerinin sayıları

| Numune (n) | İzolasyon Materyali | IPN-Pozitif İzolasyon Materyali (%) |
|--------------------|---------------------|-------------------------------------|
| Seminal sıvı (235) | 47 | 1 (% 2,12) |
| Ovarial sıvı (310) | 62 | 6 (%9,67) |
| Yavru balık (670) | 134 | 19 (%14,17) |
| Toplam (1215) | 243 | 26 (%10,69) |



Şekil 1. IPNV'nin kontroller ve numunelerin pozitif-negatif agaroz gel elektroforez görüntüsü. 1: Negatif kontrol, 2: Pozitif kontrol 3, 6, 7, 8 ve 11: Pozitif saha örneği, 4, 5, 9 ve 10: Negatif saha örneği

Fig 1. Agarose gel electrophoresis of IPNV positive-negative specimens and controls. 1: Negative control, 2: Positive control, 3, 6, 7, 8 and 11: Positive field of samples, 4, 5, 9 and 10: Negative field of samples

transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) testi uygulanmıştır. RT-PZR testi sonucunda, toplam 243 izolasyon materyalinin 26'sında (%10,7) IPN viral nükleik asidin varlığı gösterilmiştir (Şekil 1). Hücrede virus izolasyonunu takiben uygulanan Ag-ELİSA testinin sonuçları ile direkt dokudan yapılan RT-PZR sonuçları karşılaştırıldığında %100 uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde özellikle tatlı sularda gökkuşuğu alabalık üretimi oldukça yoğun yapılmaktadır. Yapılan araştırmalarda, 2010 yılı verilerine göre avlanan deniz balığı miktarı toplam 120 bin ton iken, deniz ve iç sularda üretimi yapılan balık miktarı 170 bin ton düzeyinde gerçekleşmiştir. Üretimi yapılan balıkların yaklaşık yarısına yakın bir kısmını, iç sularda yetiştiriciliği yapılan alabalıklar oluşturmaktadır ¹.

IPNV taşıyıcısı olan balıkların tespiti için, üreme (sağım) döneminde seminal ve ovarial sıvıları ile yavru balıklarda kuyruk ve solungaçlar kesildikten sonra balığın tamamının izolasyon materyali olarak kullanılabilirliği bildirilmektedir ^{5,20}. IPNV izolasyonu işlemlerinde de genellikle BF-2 (bluegill fry, *Lepomis macrochirus*), RTG (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* gonad), CHSE-214 (chinook salmon, - *Oncorhynchus tshawytscha* embryo), FHM (fathead minnow, - *Pimephales*

promelas epitheloid cell) ve EPC (epithelioma papillosum of carp, - *Cyprinus carpio*) hücre hatları kullanılmaktadır. Bu hücreler arasında IPNV'a en duyarlı hücre hatlarının BF-2 hücreleri olduğu bildirilmektedir ^{2,5,16}. Bundan dolayı bu çalışmada, IPNV izolasyonunda BF-2 hücreleri kullanılmıştır.

Gökkuşuğu alabalıklarında IPNV enfeksiyonları ile ilgili olarak Türkiye'de yapılan çalışmalar ^{4,11-13} vaka bildirimini veya lokal ¹⁴ olup, hem enfeksiyonun Türkiye'deki yaygınlığı hakkında bir veri içermemekte, hem de IPNV izolasyon materyali olarak sadece balıklar kullanılmıştır. Bu çalışmada ise, klinik olarak hastalığın ortaya çıkmasına bakılmaksızın, belli bir dönemde Türkiye'nin farklı bölgelerinden alınan alabalık izolasyon materyalleri (yavru alabalık, ovarial ve seminal sıvılar) IPNV bakımından analize tabi tutulmuş ve IPNV izole edilmiştir. Gökkuşuğu alabalıklarında IPNV enfeksiyonlarının varlığını ve yaygınlığını Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi'nde araştıran çalışmada ¹⁴ ise, toplam 32 alabalık çiftliğinin 10'undaki (%31,25) yavru ve porsiyon balıklardan elde edilen toplam 229 izolasyon materyallerinin 10'unda (%4,36) IPNV izole edildiği bildirilmektedir. Çalışmamızda, alabalık çiftliklerinden alınan toplam 243 izolasyon materyalinin 26'sında (%10,69) IPNV saptanırken (Tablo 3), izolasyon materyali alınan alabalık çiftliklerinin bulunduğu illerin %63,6'ında ve çiftliklerin de %56,6'sında IPNV bulunduğu tespit edilmiştir. Her iki araştırmanın sonuçları karşılaştırıldığında, çalışmamızda elde edilen IPNV pozitif izolasyon materyallerinin ve çiftlik sayılarının daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum, çiftliklerden sağlanan örnek sayılarının fazlalığından veya enfeksiyonun yoğunluğundan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada kullanılan izolasyon materyallerinden elde edilen %10,69 oranındaki IPNV izolasyonu, gökkuşuğu alabalıklarında IPNV enfeksiyonunun Türkiye'de yaygınlığının yoğun olduğunu göstermektedir. Meksika'da ise, bir eyalette bulunan 10 yerleşim biriminin 8'inde (%80), ayrıca numune alınan 29 gökkuşuğu alabalık çiftliğinin de 25'inde (%86,2) IPNV izole edilmiştir ⁷. Araştırmacılar, bu oranın yüksek olmasını, farklı büyüklükteki balıkların çiftlikler arası yoğun transfer işlemlerine, bazı çiftliklerin su kaynaklarının aynı olmasına, bazı çiftliklerde ise üretimde kullanılan suyun tekrar üretimde kullanılmasına bağlamaktadırlar. Çalışmamızda, IPNV enfeksiyonunun yüksek oranda bulunmasındaki en önemli faktörün, kontrolsüz yapılan yumurta, yavru ve porsiyon balık nakillerinin olduğu düşünülmektedir.

Smail ve ark.'ları ²⁰ tarafından IPNV izolasyonu amacıyla 2003-2005 yılları arasında yapılan bir çalışmada, izolasyon materyali olarak 8 farklı Atlantik somon balığı popülasyonundan temin edilen ovarial ve seminal sıvılar kullanılmıştır. Araştırma sonucunda ovarial sıvılardaki izolasyon oranlarının (2003 yılı için %9,13, 2004 yılı için %4,30, 2005 yılı için %0,009), seminal sıvılardaki izolasyon oranlarından (2003 yılı için %1,18, 2004 yılı için %0,76, 2005 yılı için %0,002) yüksek olduğu bulunmuştur. Bu çalışmamızda kullanılan ovarial izolasyon materyallerinden de, seminal izolasyon materyallerine göre daha fazla sayıda IPNV izole edilmiştir (sıra-

sıyla %9.67 - %2.22, *Tablo 3*). Elde edilen bu sonuç, Smail ve ark.'larının²⁰ elde ettikleri sonuçla uyumluluk göstermektedir. Ovarial sıvılarda IPNV izolasyon oranının seminal sıvılardan daha yüksek olması, ovarial sıvıların IPNV'nu daha fazla absorbe etmesinden kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir²⁰. IPNV balık yumurtası kabuğuna affinitesinin (ilgisinin) olduğu, yumurtanın içine girdiği ve gözlenmiş yumurtadan dezenfeksiyonla virüsün giderilemediği bildirilmiştir^{21,22}. IPNV'nin seminal ve ovarial sıvıların içeriğinde bulunması ve bu şekilde taşınması, genellikle intra ovarial veya vertikal taşınma şeklinde değerlendirilmektedir²³. Balık üretimi entegre yetiştiricilik şeklinde yapıldığından, üretim aşamasında biyolojik ürünlerin bir yerden başka bir yere nakledilmesiyle enfeksiyöz ajanların yayılması da kolaylaşmaktadır. Dolayısıyla seminal ve ovarial sıvılarda ve yavru balıklarda virüsün varlığı, hastalığın yaygınlığını artırmaktadır^{2,3,20-25}.

IPNV enfeksiyonunun teşhisinde standart teşhis metodu, IPN virusunun duyarlı hücre kültüründe izolasyonudur^{5,26}. Hücrede izolasyonunu takiben, IPNV identifikasyonunda en yaygın olarak kullanılan serolojik metotlar nötralizasyon testi, floresans antikor tekniği (FAT), immunoperoksidaz ve enzyme linked immunosorbent assay (ELİSA) olduğu rapor edilmiştir^{5,7,27,28}. Ayrıca, daha az sıklıkla kullanılanlar immunoperoksidaz, komplement fikzasyon tekniği, immunoblot ve Polimeraz zincir reaksiyonu gibi teknikler çeşitli araştırmalar tarafından kullanılmıştır^{2,29,30}. IPNV'nun dokudan direkt olarak tespit etmek amacıyla RT-PZR test metodu da kullanılmış ve bu metot birçok araştırmacı tarafından daha hassas bulunmuştur^{6,7,14,17}. Bu araştırmada hücre kültüründe izole edilen virus uygulanan Ag-ELİSA testi sonuçları ile direkt dokudan yapılan RT-PZR testi sonuçlarının her ikisinin de %100 uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, virus izolasyon yöntemine göre daha ucuz ve daha hızlı bir metot olan RT-PZR testinin, IPNV'nin direkt dokudan tanısında alternatif bir metot olarak kullanılabilmesi tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, Doğu ve Orta Anadolu bölgelerinde tatlı sularda gökkuşuğu alabalık üretimi yapılan çiftliklerde, seminal ve ovarial sıvılarda ve yavru balıklarda yüksek oranda IPNV'nin bulunduğu tespit edilmiştir. IPNV'nin, daha fazla su kaynağına ve alabalık çiftliklerine bulaşmasını engellemek veya minimize etmek için, özellikle yavru alabalık nakillerinde IPNV kontaminasyonuna karşı dikkatli olunması gerekmektedir. Bunun yanında kontamine olmamış balıklarla ve balık transfer malzemeleriyle üretim yapılmamasına özen gösterilmelidir.

KAYNAKLAR

- Anonim:** Su ürünleri istatistikleri 2010 yılı raporu, Türkiye İstatistik Kurumu, 2010.
- Wolf K:** Infectious pancreatic necrosis. **In**, Wolf K (Ed): Fish viruses and fish viral diseases. pp. 115-157, Cornell University Press, Ithaca, NY, 1988.
- Smail DA, Munro ALS:** Infectious pancreatic necrosis virus persistence in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* L. **In**, Ellis AE (Ed): Fish and Shellfish Pathology. pp. 277-288, Academic Press, New York, 1985.
- Ogut H, Altuntas C:** Occurrence and prevalence of infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in cages in the Black Sea. *Aquacult Res*, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.02959.x.
- Anonim:** Infectious pancreatic necrosis. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Office International des Epizooties, 2003.
- Taksdal T, Dannevig BH, Rimstad E:** Detection of infectious pancreatic necrosis (IPN)-virus in experimentally infected Atlantic salmon parr by RT-PCR and cell culture isolation. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 21, 214-219, 2001.
- Ortega C, Vega F, Enríquez R:** Occurrence of the infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Hidalgo State, Mexico. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 27(3): 100-107 2007
- Varvarigos P, Way K:** First isolation and identification of the infectious pancreatic necrosis (IPN) virus from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fingerlings farmed in Greece. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 22 (3): 195-199, 2002.
- Crane MSJ, Hardy-Smith P, Williams LM, Hyatt AD, Eaton LM, Gould A, Handlinger J, Kattenbelt J, Gudkovs N:** First isolation of an aquatic birnavirus from farmed and wild fish species in Australia. *Dis Aquat Org*, 43, 1-14, 2000.
- Zhao ZF, Ke F, Li Z, Gui J, Zhang O:** Isolation, characterization and genome sequence of a birnavirus strain from flounder *Paralichthys olivaceus* in China. *Arch Virol*, 153, 1143-1148, 2008.
- Candan A:** First report on the diagnosis of infectious pancreatic necrosis (IPN) based on reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in Turkey. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 22 (1): 45, 2002.
- Değirmenci U, Nemli E, Çağırğan H:** Türkiye'nin değişik bölgelerinden enfeksiyöz pankreatik nekrozis virüsü izolasyonu. *I. Ulusal Alabalık Sempozyumu, 14-16 Ekim, Isparta*, p. 35, 2008.
- Toplu N, Albayrak H, Aydoğan A, Epikmen ET, Metin N:** Gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) enfeksiyöz pankreatik nekrozis patogenezesinde apoptozisin rolü. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 57, 191-196, 2010.
- Albayrak H, Özan E:** Gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) enfeksiyöz pankreatik nekrozis ve enfeksiyöz hematopoietik nekrozis virus enfeksiyonlarının varlığının araştırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 57, 125-129, 2010.
- Anonim:** Hayvan hastalıkları ile mücadele ve hayvan hareketleri kontrolü genelgesi. Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, 2012.
- Lorenzen E, Carstensen B, Olesen NJ:** Interlaboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV. *Dis Aquat Org*, 37, 81-88, 1999.
- Dopoza CP, Barja JL:** Diagnosis and identification of IPNV in salmonids by molecular methods. **In**, Cunningham CO (Ed): Molecular Diagnosis of Salmonid Disease. pp. 23-48, Kluwer Academic Publishers, Notherlans, 2002.
- Anon:** Qiagen one step RT-PCR kit handbook. <http://www.qiagen.com>. Accessed: 02.11.2010.
- Williams K, Blake S, Sweeny A, Singer JT, Nicholson BL:** Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. *J Clin Microbiol*, 37, 4139-4141, 1999.
- Smail DA, Munro ES:** Isolation and quantification of infectious pancreatic necrosis virus from ovarian and seminal fluids of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis*, 31 (1): 49-58, 2008.
- Snieszko SF, Wood EM, Yasutake WT:** Infectious pancreatic necrosis in trout. A.M.A. *Archives of Pathology* 63, 229-233, 1957.
- Ahne W, Negele RD:** Studies on the transmission of infectious pancreatic necrosis virus via eyed eggs and sexual products of salmonid fish. **In**, Ellis AE (Ed): Fish and Shellfish Pathology. Academic Press, pp. 261-269, 1985.
- Mulcahy D, Pascho RJ:** Adsorption of fish sperm to vertically transmitted fish viruses. *Sci Magazine*, 225, 333-335, 1984.
- Ahne W, Kelly RK, Schlotfeldt HJ:** Factors affecting the transmission and outbreak of infectious pancreatic necrosis (IPN). **In**, Lillelund K, Rosenthal H (Eds): Fish Health Protection Strategies. Federal Ministry for Research and Technology, Hamburg/Bonn, pp. 19-67, 1989.
- Dorson MCT:** Experimental transmission of infectious pancreatic

necrosis virus via the sexual products. **In**, Ellis AE (Ed): Fish and Shellfish Pathology. pp. 251-260, Academic Press, London, 1985.

26. Agius C, Mangunwiryo H, Johnson RH, Smail DA: A more sensitive technique for isolating infectious pancreatic necrosis virus from asymptomatic carrier rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Dis*, 5, 285-292, 1982.

27. Hill BJ, Way K: Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virüs and other aquatic birnaviruses, *Ann Rev Fish Dis*, 5, 55-77, 1995.

28. Dixon PF, Hill BJ: Rapid detection of infectious pancreatic necrosis

virus (IPNV) by the enzyme-linked immunosorbent assay. *J Gen Virol*, 64, 321-330, 1983.

29. McAllister, PE, Schill, WB: Immunoblot assay: A rapid and sensitive method for identification of salmonid fish viruses. *J Wildl Dis*, 22, 468-474, 98, 1986.

30. Lopez-Lastra M, Gonzalez M, Jashes M, Sandino AM: A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription (RT)-polymerase chain-reaction (PCR). *J Fish Dis*, 17, 269-282, 1994.