

Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) infeksiyöz pankreatik nekrozis ve infeksiyöz hematopoietik nekrozis virus enfeksiyonlarının varlığının araştırılması

Harun ALBAYRAK, Emre ÖZAN

Samsun Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Viroloji Laboratuvarı, Samsun.

Özet: Bu çalışmada, Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinde (Samsun, Sinop, Ordu, Giresun, Trabzon, Rize, Amasya, Tokat, Gümüşhane) tatlı sularındaki ticari gökkuşığı alabalık çiftliklerinde IPN ve IHN viruslarının varlığı araştırıldı. Bu amaçla, 2006-2007 yılları Aralık-Mart aylarında (su sıcaklığının 12 °C'nin altına düştüğü dönem) bölgedeki 32 çiftlikten, 168'i (200-500 g) porsiyon balıklardan, 61'i (305 adet yavru alabalıktan, 3-10 g'lık yavru) yavru balıklardan olmak üzere toplam 229 izolasyon materyali temin edildi. İzolasyon materyallerinin BF-2 hücresinde iki pasajı yapıldı. Cytopathic effect (CPE) gösteren hücre kültür süpernatantları antijen enzyme linked immunosorbent assay (Ag-ELISA), izolasyon materyalleri ise reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ile test edildi. Sonuç olarak, Ordu, Samsun, Tokat ve Trabzon illerinde bulunan 10 çiftlikte yavru ve porsiyon balıklardan IPN virusu tespit edilirken, IHN virusu tespit edilemedi. Hücre kültürü izolasyonu ve RT-PCR testlerinin birbiriyle uyumlu olduğu ortaya konuldu.

Anahtar sözcükler: CPE, infeksiyöz hematopoietik nekrozis, infeksiyöz pankreatik nekrozis, RT-PCR

Investigating the presence of infectious haematopoietic necrosis and infectious pancreatic necrosis virus infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)

Summary: In this study, presence of infectious pancreatic necrosis and infectious haematopoietic necrosis (IHN) viruses were investigated in fresh water in commercial rainbow trout in middle and east Black Sea region (Samsun, Sinop, Ordu, Giresun, Trabzon, Rize, Amasya, Tokat, Gümüşhane). For this purpose, total of 229 isolation material from 168 portion rainbow trout of various sizes (200 to 500 g) and 61 immature fish (from 305 immature fish, weighing 3-10 g) were obtained from 32 farms in the region in December and March in 2006-2007 which period is water temperature under the 12 °C. All isolation materials were passaged in BF-2 (Bluegill fry-2) cell cultures for two times. While cell culture supernatants showed cytopathic effect (CPE) were tested by antigen-capture enzyme linked immunosorbent assay (Ag-ELISA), all isolation materials were tested by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). As a result, while IPN virus was detected in immature fish and portion rainbow trout in 10 farms in Ordu, Samsun, Tokat and Trabzon provinces, IHN virus was not detected. That cell culture isolation and RT-PCR test are harmonious were revealed.

Key words: CPE, infectious haematopoietic necrosis, infectious pancreatic necrosis, RT-PCR.

Giriş

Türkiye'de son yıllarda hızla gelişmekte olan kültür balıkçılığı, Karadeniz Bölgesi'nde de pek çok alabalık üretim çiftliğinin kurulmasına neden olmuştur. Ülkemizde su ürünleri yetiştiriciliği yapan işletmelerin yaklaşık olarak % 70'ini alabalık çiftlikleri oluşturmaktadır (1,2).

İnfeksiyöz pankreatik nekrozis (IPN) genç salmomidlerin oldukça bulaşıcı, pankreas nekrozu ile karakterize, perakut ve akut seyirli, mortalitesi yüksek viral bir enfeksiyondur (8,12,25). İnfeksiyöz hematopoietik nekrozis (IHN) ise, alabalıklarda hematopoietik dokuların nekrozu ile karakterize akut ve subakut seyirli viral bir enfeksiyondur. IPN ve IHN salmomid balıkların yanı sıra salmomid olmayan balıklar ve kabuklularda da görülmektedir (8,11). Enfeksiyonun ortaya çıkmasında su sıcaklığı

önemli bir faktördür. Enfeksiyonlar genellikle su sıcaklığı 15 °C'nin altına düştüğünde ortaya çıkmaktadır. Enfeksiyonu geçiren alabalıklar, memelilerdeki herpes virus enfeksiyonlarında olduğu gibi virusları ömür boyu taşırlar. Enfeksiyonlar, anaç balıklardan vertikal olarak veya balıkların suya bıraktıkları salgılar (idrara, sperma ve yumurta sıvıları) ile horizontal olarak bulaşmaktadır. Enfekte balıklar suya çok fazla miktarda virus bırakırlar (3,4,11,25). Enfeksiyonlar, viruslarla kontamine yumurta/yavru balıkların ülkeler arası nakilleri ve enfekte anadrom balıkların göçü ile kıtalar arasında yayılmaktadır (19).

IPN, *Birnaviridae* familyasında *Aquabirnavirus* genusu içinde yer alır. Virus iki segmentli, çift iplikçikli RNA karakterinde genoma sahip, zarsız, ortalama 60 nm çapında ikozahedral kapsitlidir (6,25).

IHNV *Rhabdoviridae* familyasında *Novirhabdovirus* genusu içinde yer alır. Mermi şeklinde olan virion, segmentsiz, negatif polariteli, tek iplikçikli RNA'ya sahiptir (7,11).

IPN ve IHN'nin teşhisinde virus izolasyonu, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ve moleküler teknikler gibi pek çok metot kullanılmaktadır (21,28)

Bugün için IPN ve IHN'nin varlığı Amerika, Avrupa, Avustralya ve Uzakdoğu da bir çok ülkede bildirilmiştir (9,11,17,25).

Bölgede ve Türkiye'de IPN ve IHN enfeksiyonlarının varlığı vaka olarak bildirilmişse de il ve çiftlikler bazında enfeksiyonların yaygınlığına dair bir veri yoktur (5,15,18,27). Bu çalışmada, gökkuşağı alabalıklarda önemli ekonomik kayıplara neden olan IPN ve IHN enfeksiyonlarının Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinde varlığının/yaygınlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Balık örnekleri: Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinde 9 ildeki (Samsun, Sinop, Ordu, Giresun, Trabzon, Rize, Amasya, Tokat, Gümüşhane) tatlı su kaynaklarında yer alan yıllık üretimi 20 ton ve üzerinde kapasitesi bulunan 32 alabalık çiftliğinden 2006-2007 yılları Aralık-Mart aylarında (su sıcaklığının 12 °C'nin altına düştüğü dönem), porsiyon balıklardan 168 (200-500 g), yavru balıklardan 61 (3-10 g'lık 305 yavru alabalıktan) olmak üzere toplam 229 izolasyon materyali temin edildi (Tablo 1).

Örneklenen porsiyon balıklardan karaciğer, dalak, böbrek, kalp ve beyin alınarak bir havuz oluşturuldu ve her bir porsiyon balık bir izolasyon materyali olarak değerlendirildi. Yavru balıkların kuyrukları kesilerek, 5 adet yavru balıktan bir adet izolasyon havuzu oluşturuldu. Örnekler antibiyotikli PBS içinde +4°C'de doku parçalayıcıda homojenize edildikten sonra, 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak, 0,45µm çaplı enjektör filtreden geçirildi.

Sterilite kontrol için örnekler alındı. Örnekler hücre kültürü inokulasyonu ve RT-PCR aşamasında kullanılmak üzere -80°C'de saklandı

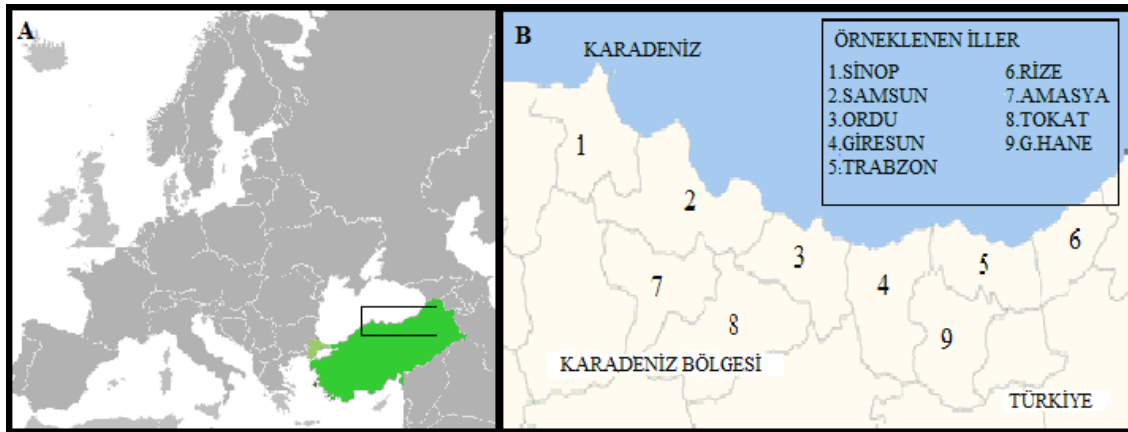
Tablo 1. Gökkuşağı alabalık çiftliklerinden elde edilen balık örneklerinin illere göre dağılımı

Table 1. Distribution of fish samples obtained rainbow trout farms according to the provinces.

İl Adı	Çiftlik Sayısı	Porsiyon balık izolasyon materyal sayısı	Yavru balık izolasyon materyal sayısı	Toplam izolasyon materyal sayısı
Samsun	6	35	23	58
Sinop	1	5	-	5
Ordu	9	43	6	49
Giresun	4	15	10	25
Trabzon	5	26	12	38
Rize	3	25	3	28
Amasya	1	3	2	5
Tokat	2	11	5	16
Gümüşhane	1	5	-	5
G.Toplam	32	168	61	229

Hücre ve virus: İzolasyon materyallerinin ekiminde kullanılan BF-2 hücresi ve kontrol virusları Ulusal Referans laboratuvar olan Bornova VKAEM'den temin edildi. Hücre ve virus üretiminde %1 Penicilin (10 000 U/ml)-Streptomisin (10 mg/ml)-Amphotericin B (0.025 mg/ml) solüsyonu ve 1 M Hepses içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ile %10 Fötal dana serumu (FDS) kullanıldı.

Virus izolasyonu: Doku örneklerinin çeşitli dilüsyonları (1/10 ve 1/100) 100 µl hacimde BF-2 hücreleri kaplanmış 24 gözlü makropleytlere inokule edildi. 15 °C'de %5 CO₂ li ortamda her gün CPE yönünden 7 gün boyunca doku kültürü mikroskopunda kontrol edildi. Dondur-çöz yapılarak toplanan hücre kültür süpernatantları 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Tüm materyaller BF-2 hücresinde 2 pasajı yapıldı. CPE tespit edilen pasaj sıvıları antijen ELISA ile test edildi.



Şekil 1. Gökkuşağı alabalıklarının toplandığı yerler

Figure 1. Areas where rainbow trout were collected for viral examination

Tablo 2. RT-PCR'da kullanılan primerlerin özellikleri.

Table 2. Properties of the primers used for RT-PCR in detecting of IPN and IHN.

Primer → (5' 3')	Proteini kodlayan gen	Ürün büyüklüğü (bp)	Referanslar
WB1, CCGCAACTTACTTGAGATCCATTATGC	VP2	206	26
WB2, CGTCTGGTTCAGATTCCACCTGTAGTG			
IHN3, GTTCAACTTCAACGCCAACAGG	N	371	26
IHN4, TGAAGTACCCACCCGAGCATCC			

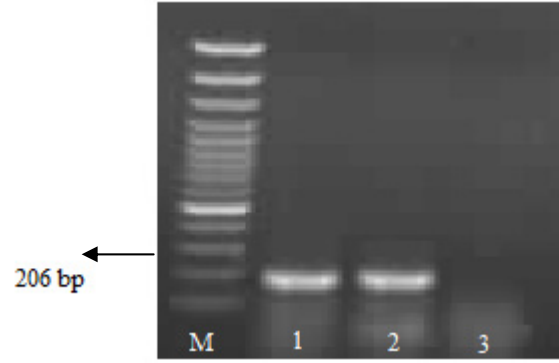
Antijen enzyme linked immunosorbent assay (Ag-ELISA): CPE tespit edilen hücre kültür süpernatantları ticari olarak temin edilen Ag-ELISA kiti (Bio-X, Belçika) ile test edildi. Testler üretici firmanın prosedürüne uygun olarak yapıldı. Test pleytleri, ELISA okuyucuda 450 nm filtre absorbands değerleri okunarak, sonuçlar hesaplandı.

RNA ekstraksiyonu ve reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR): Tüm organ homojenizatlarına RT-PCR yapıldı. Virus RNA'sı Chomcyznski ve Sacchi (16) tarafından bildirilen asid-guanidium-phenol-chloroform-isoamyl alcohol karışımı kullanılarak ekstrakte edildi. Elde edilen pellet 20 µl distile su ile sulandırıldı. cDNA sentezine başlamadan önce, RNA içindeki muhtemel sekonder yapıları ortadan kaldırmak için, 70 °C'de 5 dakika ön ısıtma yapıldı. Komplementer DNA (cDNA) sentezi 25mM Tris-HCl, 25 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10mM DTT, 50 ng random heksamer primer, 200 U Moloney murine leukemia virus reverse transkriptase (MMLV-RT) (MBI, Fermentas, Lithuania) ve 10 U RNase inhibitör karışımı içinde 25 °C'de 10 dakika, 37 °C'de 1 saat ve 70 °C'de 10 dakikadan oluşan program süresinde inkubasyona bırakıldı.

Amplifikasyonlarda kullanılan primer dizileri ve özellikleri Tablo 2'de verildi. Amplifikasyon, 3 µl cDNA, 75 mM Tris-HCl (pH8,8), 20 mM NH₄(SO₄)₂, 1,5 mM MgCl₂, 10 pmol'ar primerler, 0,2 mM dNTP, ve 0,5 U Taq DNA polimeraz (MBI, Fermentas, Lithuania) karışımı içinde her iki primer çifti için de , 94 °C'de 4 dakikayı takiben, 94 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 90 saniye süren program 40 defa tekrarlandıktan sonra 72 °C'de 10 dakika süren programda thermal cyclerde (Thermo PX2, USA) inkubasyona bırakıldı. 5 µl PCR ürünü 0,5 TAE içindeki 0,5 µg/ml ethidium bromid içeren %1,5 agar içinde 80 V'da 40 dakika elektroforeze tabi tutuldu. DNA bantları ultraviyole ışık altında değerlendirildi.

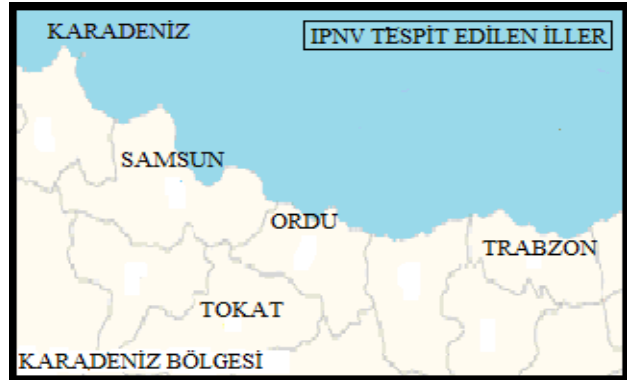
Bulgular

Virus izolasyonu: Örnek sağlanan 229 izolasyon materyalinin 10'unda (%4.36) CPE tespit edildi. İzolasyonlar hem yavru hem de porsiyon balıklardan elde edildi. İzole edilen bu viruslar yapılan Ag-ELISA testleri sonucunda IPN olarak tanımlandı.



Şekil 2. IPNV'nin agaroz gel elektroforez görüntüsü M: 100 bp merdiven (Fermentas, Litvanya), 1:Pozitif kontrol, 2: Pozitif saha örneği, 3: Negatif kontrol.

Figure 2. Agarose gel electrophoresis of IPNV positive specimen and controls. Line M: 100 bp DNA ladder (Fermentas, Lithuania), Line 1: positive control, Line 2: positive field sample, Line 3: negative control



Şekil 3. IPNV izole edilen iller

Figure 3. Provinces isolated IPNV

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR): RT-PCR testi sonucunda, 229 adet materyalin 10'unda (%4.36) IPN viral nükleik asiti tespit edilirken, örneklerin hiçbirisinde IHN nükleik asidi tespit edilemedi. IPN virusu 9 ilin 4'ünde (%44.44), 32 çiftliğin 10'unda (%31.25) tespit edildi.

Tartışma ve Sonuç

Türkiye'de gökkuşuğu alabalık üretimi, balıkçılık endüstrisinde önemli bir yer tutmaktadır. Türkiye'de iç sularda yapılan üretimin %55,7'sini gökkuşuğu alabalık üretimi oluşturmaktadır. Karadeniz Bölgesi tatlı sularda ve denizde doğal ve kültür balıkçılığı üretiminde Tür-

kiye'nin en önemli bölgesidir. Özellikle tatlı sularda gökkuşuğu alabalık üretimi oldukça yoğun yapılmaktadır (1,2).

IPN ve IHN enfeksiyonları ticari alabalık işletmelerinde büyük ekonomik kayıplara sebep olmasının yanında, uluslararası ticarete de kısıtlamalara yol açmaktadır. Bu nedenle, IPN ve IHN enfeksiyonları için uluslararası düzenlemeler yapılmıştır. Avrupa Birliği 91/67/EEC komisyon kararıyla Annex A'da yer alan balık hastalıkları bölümünde IPN liste III'te, IHN ise liste II'de yer almaktadır.

IPN ve IHN'nin izolasyonunda 4 cm'den küçük yavrularda böbrek dahil tüm iç organlar, 4 cm'den büyük balıklarda böbrek, dalak, kalp, karaciğer, beyin ve anaçlarda ovarial sıvılar virus izolasyonunda kullanılması önerilmektedir. Özellikle taşıyıcıların tespiti için beyin ve kalbin kullanılması önemlidir (3,4,11,25).

IPN ve IHN'nin izolasyonunda, bluegill fry (BF-2), rainbow trout gonad (RTG-2), epithelioma papulosum cyprini (EPC), fathead minnow (FHM), chinook salmon embryo (CHSE-214), pike gonad (PG) hücreleri kullanılmaktadır. Her iki virusun izolasyonunda da BF-2 en duyarlı hücre hatlarının başında gelmektedir (3,4,22,29). Bu nedenle, çalışmada izolasyon için BF-2 hücreleri kullanıldı. 229 adet izolasyon materyalinden yapılan ekimlerde ve takiben yapılan 2 pasajda 10 adet CPE tespit edildi. CPE'ler Ag-ELISA ile IPN olarak tanımlandı. IPN ve IHN enfeksiyonlarının varlığı, dünyada (9,11,17) ve ülkemizde (5,15,18,27) yapılan pek çok çalışmayla bildirilmiştir. Bu çalışmada tatlı sularda (akarsu ve baraj göllerinde) örnek sağlanan 32 gökkuşuğu alabalık çiftliğinde IHN virusu tespit edilememesine karşın, 10 çiftlikte IPN virusu tespit edilmiştir. Bölgede IPN enfeksiyonunun yaygın (%44.44) olarak tespit edilmesine karşın, IHN'nin tespit edilememesinin en önemli nedeni; çiftliklerin bulunduğu akarsu ve göllerin IHN virusu ile kontamine olmamasına ve damızlık balıkların bu virusu taşımamalarına bağlanabilir. Her iki enfeksiyonun yayılmasında da vertikal ve horizontal bulaşma önemli yer tutmaktadır (11,25). Bölgede çiftlikler arasında sıklıkla yumurta, yavru balık ve porsiyon balık alışverişi yapılmaktadır. Bu çalışmada sadece yavru ve porsiyon balıklar kullanılmakla birlikte, literatür bilgileri ışığında (11,25) IPN enfeksiyonunun bölgede yüksek oranda tespit edilmesinde en önemli faktör olarak kontrolsüz yapılan yumurta, yavru ve porsiyon balık nakilleri düşünülmektedir. Bu çalışmada, yıllık üretim kapasitesi en az 20 ton ve üzeri olan işletmeler örneklenmiştir. Örneklemeler hem akarsu hem de baraj göllerinde bulunan işletmelerden yapılmıştır. Örneklenen işletmeler içinde kuluçkahanesi olan işletmeler olduğu gibi, sadece yavru balıktan porsiyon balık üreten işletmelerde mevcuttur. IPN enfeksiyonları

Samsun ve Tokat illerinde baraj göllerinde (Derbent barajı ve Almus barajı) tespit edilirken, Ordu ve Trabzon illerinde ise akarsularda kurulu bulunan işletmelerden tespit edilmiştir. IPNV hem kuluçkahaneye sahip olan hem de sadece yavru balıktan porsiyon balık yetiştiren işletmelerde tespit edilmiştir. Ayrıca, Ordu ili Perşembe ilçesindeki deniz kafeslerinde, Trabzon ili Maçka ilçesindeki akarsuda bulunan kafeslerden nakil edilen porsiyon balıklardan IPN tespit edilmiştir. Yine Maçka ilçesindeki aynı işletmeden IPNV izole edilmiştir. IPN enfeksiyonunun Ordu ilinde (%55.55) yüksek oranda tespit edilmesindeki önemli faktör olarak ise, gökkuşuğu alabalıklarının erken gelişimini sağlamak ve ekonomik karlılığı arttırmak amacıyla, ilin Perşembe ilçesinde denizde bulunan balık kafeslerine başta Samsun ve Ordu olmak üzere bir çok ilden canlı porsiyon gökkuşuğu alabalığı naklinin yapılmasının rol oynadığı sanılmaktadır.

IPN ve IHN'nin hücrede izolasyonu takiben identifikasyonunda ve direkt dokudan teşhisinde bir çok test metodu kullanılmıştır (10,13,14,20,21). Miller ve ark. (23) IHN'nin tanısında, hücrede izolasyonu takiben yapılan identifikasyon metodlarının (immunofluorescent antibody test-IFAT, reverse transcriptase polymerase chain reaction-RT-PCR, nested PCR) direkt doku örneklerinden yapılan RT-PCR'den daha az duyarlı olduğunu bildirmiştir. Blake ve ark. (10) IPN'in tanısında, virus izolasyonu ve RT-PCR'nin %100 uyumlu olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada, hücrede virus izolasyonunu takiben yapılan Ag-ELISA ile direkt dokudan yapılan RT-PCR sonuçları karşılaştırıldığında, IPN virusu için hücre izolasyonu ile RT-PCR'nin %100 uyumlu olduğu tespit edilmesine karşın, IHN virusu her iki metotla da tespit edilemediğinden bir karşılaştırma yapılmadı.

Sonuç olarak, altın standart olarak kabul edilen virus izolasyon yöntemine göre daha ucuz ve daha hızlı bir test metodu olan RT-PCR, IPN'nin direkt dokudan tanısında alternatif bir metot olarak kullanılabilceği ortaya konuldu. Bölgede daha önceden varlığı bilinen (5,24) ve bu çalışma ile yüksek oranda yaygınlığı tespit edilen IPN'nin daha fazla su kaynağına ve alabalık çiftliklerine bulaşmasını engellemek için, tatlı sulardan denize ve denizden tatlı sulara yapılan gökkuşuğu alabalık nakillerinde dikkatli olunması, özellikle IPN ve IHN yönünden kontamine olmamış tatlı suların latent enfekte balık ve transferde kullanılan malzemeler ile kontamine edilmemesine dikkat edilmesi enfeksiyonun sınırlanması bakımından önemlidir.

Kaynaklar

1. **Anonim** (2005): *İl ve Türlerine Göre Avlanan Tatlı Su Ürünleri*. Devlet İstatistik Enstitüsü Başkanlığı 2003 yıllık raporu.

2. **Anonim** (2005): *Kültür Balıkları Üretimi*. Devlet İstatistik Enstitüsü Başkanlığı 2003 yıllık raporu.
3. **Anonim** (2006): *Infectious Pancreatic Necrosis*. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Erişim: http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_00025.htm. Erişim tarihi: 01.02.2009.
4. **Anonim** (2006): *Infectious Haematopoietic Necrosis*. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Erişim: http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_00019.htm. Erişim tarihi: 01.02.2009.
5. **Anonim** (2007): *2004-2007 Epidemiyoloji Ünitesi Hastalık Çıkış Raporları*. Samsun Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Hastalık Çıkış Raporları Arşivi.
6. **Anonim** (2009): *Birnaviridae*. International Committee on Taxonomy of Viruses. Erişim: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_birna.htm. Erişim Tarihi: 06.02.2009.
7. **Anonim** (2009): *Rhabdoviridae*. International Committee on Taxonomy of Viruses. Erişim: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_rhabd.htm. Erişim Tarihi: 06.02.2009.
8. **Arda M, Seçer S, Sarıeyyüpoğlu M** (2002): *Balık Hastalıkları*. Medisan yayınevi, Ankara.
9. **Besse P, de Kinkelin P** (1965): *Sur l'existence en France de la nécrose pancréatique de la truite arc en ciel (Salmo gairdneri)*. B Acad Vet France, **38**, 185-190.
10. **Blake SL, Schill WB, McAllister PE, Lee MK, Singer JT, Nicholson BL** (1995): *Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay*. J Clin Microbiol, **33**, 835-839.
11. **Bootland LM, Leong JC** (1999): *Infectious haematopoietic necrosis virus*. 57-121. In: PTK Woo, DW Bruno (Eds), Fish Diseases and Disorders, Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI Publishing, Oxon.
12. **Bowers RM, Lapatra SE, Dhar AK** (2008): *Detection and quantitation of infectious pancreatic necrosis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction using lethal and non-lethal tissue sampling*. J Virol Methods, **147**, 226-234.
13. **Brañas MV, Morales JC, Estepa A** (1994): *A sandwich ELISA to detect VHSV and IPNV in turbot*. Aquacult Int, **2**, 206-217.
14. **Bruchhof B, Marguart O, Enzmann PJ** (1995): *Differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses by reverse transcriptase-dependent polymerase chain reaction*. J Virol Methods, **55**, 111-119.
15. **Candan A** (2002): *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**, 45.
16. **Chomczynski P, Sacchi N** (1987): *Single-Step Method of RNA Isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, **162**, 156-159.
17. **Chikova V, Ilieva D** (2004): *Detection of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus in rainbow trouts in Bulgaria*. Bulg J Vet Med, **7**, 129-135.
18. **Değirmenci U, Nemli E, Çağırğan H** (2008): *Türkiye'nin değişik bölgelerinden enfeksiyöz pankreatik nekrozis virüsü izolasyonu*. I. Ulusal Alabalık Sempozyumu, Isparta, s.35.
19. **Hill BJ** (1992) *Impact of Viral Diseases of Salmonid Fish in the European Community*. 48-59. In: T Kimura (Ed), Proceedings of the OJI International Symposium on Salmonid Diseases. Hokkaido University Press, Sapparo.
20. **Knüsel R, Bergmann SM, Einer-Jensen K, Casey J, Segner H, Wahli T** (2007): *Virus isolation vs RT-PCR: which method is more successful in detecting VHSV and IHNV in fish tissue sampled under field conditions?* J Fish Dis, **30**, 559-568.
21. **Liu Z, Teng Y, Liu H, Jiang Y, Xie X, Li H, Lv J, Gao L, He J, Shi X, Tian F, Yang J, Wie C** (2008): *Simultaneous detection of three fish rhabdoviruses using multiplex real-time quantitative RT-PCR assay*. J Virol Methods, **149**, 103-109.
22. **Lorenzen E, Carstensen B, Olesen NJ** (1999): *Interlaboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV*. Dis Aquat Org, **37**, 81-88.
23. **Miller TA, Rapp J, Wastlhuber U, Hoffmann RW, Enzmann PJ** (1998): *Rapid and sensitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells*. Dis Aquat Org, **34**, 13-20.
24. **Nishizawa T, Savaş H, Işdan H, Üstündağ 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.
25. **Reno PW** (1999): *Infectious Pancreatic Necrosis and Associated Aquatic Birnaviruses*. 1-55. In: PTK Woo, DW Bruno (Eds), Fish Diseases and Disorders, Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI Publishing, Oxon.
26. **Sweeney A** (1996): *Multiplex PCR Assay for the Simultaneous Detection of IPNV and IHNV*. M.S. thesis, University of Maine, Orono, Maine.
27. **Toplu N, Albayrak H, Aydoğan A, Epikmen ET, Metin N** (2008): *Gökkuşluğu alabalıklarının (Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1972) enfeksiyöz pankreatik nekrozunda (IPN) patolojik bulgular, apoptozis, immunohistokimyasal ve PCR tanı*. IV. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi, Antalya, s. 149-150.
28. **Williams K, Blake S, Sweeney A, Singer JT, Nicholson BL** (1999): *Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses*. J Clin Microbiol, **37**, 4139-4141.
29. **Wolf K** (1988) *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, New York.

Geliş tarihi: 02.03.2009 / Kabul tarihi: 14.07.2009

Yazışma Adresi:

Dr. Harun Albayrak
Samsun Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü
Müdürlüğü,
Viroloji Laboratuvarı
55200, Atakum/Samsun
E-mail: harunalbayrak55@msn.com