



Koi (*Cyprinus carpio*) ve Japon Balıklarında (*Carassius auratus*) Betanodavirus Varlığının Araştırılması

Ufuk OĞUZ^{1*} , Murat KAPLAN² , Gülnur KALAYCI² 

¹ Akdeniz Su Ürünleri Araştırma, Üretim ve Eğitim Enstitüsü, 07190, Döşemealtı-Antalya-Türkiye

² İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, 35030, Bornova-İzmir-Türkiye

ÖZ

Nodaviridae familyasında yer alan *betanodavirus*'un neden olduğu Viral nervöz nekrozis (VNN) ya da bir diğer adıyla Viral ensefalopati-retinopati (VER) dünyanın pek çok yerinde hem deniz balıklarında hem de tatlı su balıklarında görülür. Larval ve yavru boylarda, nadiren de yetişkin balıklarda hastalığa neden olmaktadır. Özellikle yetiştiriciliği yapılan balık türlerinde önemli ekonomik kayıplara neden olduğu için son yıllarda enfeksiyonla ilgili araştırmalara odaklanılmıştır. Bu çalışmada, Antalya bölgesinde yetiştiricilik faaliyeti gösteren akvaryum işletmelerinde Koi ve Japon balığı türlerinde *betanodavirus* varlığı araştırılmıştır. Üç farklı akvaryum işletmesinden her bir türü temsilen en az 30'ar adet olmak üzere toplam 180 balık örneklendi ve Real Time RT-PCR (RT-qPCR) metodu ile test edildi. Çalışma sonunda hiçbir örnekte *betanodavirus* RNA'sına rastlanmadı. Bu çalışma ile Türkiye'de koi ve japon balığı türlerinde *betanodavirus* varlığı moleküler tekniklerle ilk defa araştırılmıştır.

Anahtar kelimeler: Betanodavirus, Japon balığı, Koi, Real Time RT-PCR (RT-qPCR), Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

ARAŞTIRMA MAKALESİ

Geliş : 06.07.2022

Düzeltilme : 26.07.2022

Kabul : 21.09.2022

Yayın : 28.04.2023

DOI:10.17216/LimnoFish.1141342

* SORUMLU YAZAR

ufuk.oguz@tarimorman.gov.tr

Tel : +90 242 251 05 85

Fax : +90 242 251 05 84



Investigation of *Betanodavirus* Presence in Koi (*Cyprinus carpio*) and Goldfish (*Carassius auratus*)

Abstract: Viral nervous necrosis (VNN), also known as Viral encephalopathy-retinopathy (VER), which is caused by *betanodavirus* in the *nodaviridae* family, is seen in both marine and freshwater fish in many parts of the world. It causes disease in larvae and juveniles, rarely in adult fish. Since it causes significant economic losses, in the recent years the research has been especially focused on the infections related to it. In this study, the presence of *betanodavirus* was investigated in Koi and goldfish species in aquarium facilities operating in the Antalya region. A total of 180 fish, at least 30 representing each species, were sampled from three different aquarium facilities and tested by the Real Time RT-PCR (RT-qPCR) method. At the end of the study, *betanodavirus* RNA was not found in any of the samples. With this study, the presence of *betanodavirus* in koi and goldfish species in Türkiye was investigated for the first time by the molecular techniques.

Keywords: *Betanodavirus*, Goldfish, Koi, Real Time RT-PCR (RT-qPCR), Türkiye

Alıntılama

Oğuz U, Kaplan M, Kalaycı G. 2023. Koi (*Cyprinus carpio*) ve Japon Balıklarında (*Carassius auratus*) Betanodavirus Varlığının Araştırılması LimnoFish. 9(1): 37-42. doi: 10.17216/LimnoFish.1141342

Giriş

Akvaryum balığı yetiştiriciliğinde koi ve japon balıkları, üretimi en çok yapılan balık türleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Ayrıca ülkemizin sıcak iklime sahip bölgelerinde giderek artan sayıda akvaryum balığı yetiştiricilik tesisleri açılmaktadır. Ancak akvaryum balığı yurtiçinde talebe karşın arzın çok az bir kısmı ülkemizde yetiştiricilik yolu ile sağlanırken halen farklı ülkelerden ithalat ile talep karşılanmaya çalışılmaktadır (Kılıçerkan ve Çek 2011; Pala ve Yılmaz 2020). Üretimin giderek artmasına paralel olarak hastalıklar ile mücadele de önem kazanmaktadır. Bu doğrultuda balıklarda enfeksiyonlara yol açan patojenlerin belirlenmesi

geleceğe yönelik araştırmalar için temel oluşturması bakımından önem arz etmektedir.

Betanodavirus, *Nodaviridae* familyasında yer alan zarsız, ikosahedral simetridir, 25-30 nm boyutunda, tek sarmallı, pozitif polariteli, iki segmentli RNA [RNA1 (3.1 kb) ve RNA2 (1.4 kb)] genomunu içeren bir virustur (Nishizawa vd. 1997). RNA1 genomik bölgesi virusun replikasyonundan sorumlu olup, RNA2 genomu ise konakçı spesifitesi ve tropizmden sorumlu genom segmentleridir (Nagai ve Nishizawa 1999; Panzarin vd. 2014). RNA2 genomik bölgesindeki değişken T4 sekansına göre gerçekleştirilmiş filogenetik analize göre etkenin dört genotipi tanımlanmıştır. Bunlar sırasıyla SJNNV (Stripped jack nervous necrosis virus), TPNNV

(Tiger puffer nervous necrosis virus), BFNNV (Barfin flounder nervous necrosis virus) ve RGNNV (Red-spotted grouper nervous necrosis virus) genotipleridir (Nishizawa vd. 1997). Ayrıca su sıcaklığı ile hastalık semptomlarının görülmesi arasında da güçlü bir korelasyon vardır (Iwamoto vd. 2000).

Horizontal bulaşta kontamine su, en önemli etmenlerdendir. Bunun yanında canlı balık yemleri (rotifer, artemia) ve kurtçuklar ile balıkçıl kuşların da rezervuar olabileceği düşünülmektedir (Vázquez-Salgado vd. 2020). Virusun yetişkin balıkların gonadlarında da bulunabildiğine dair çalışmalar mevcut olduğundan vertikal bulaşmadan da söz edilebilir (Mushiaki vd. 1994, Dalla Valle vd. 2000).

VNN, balıkların önemli viral enfeksiyonlarından ve üreticilerin büyük çaplı ekonomik kayıplar yaşamalarına neden olmaktadır. Dünya genelinde 120'den fazla balık türünde virusun izole edildiği bildirilmiştir (Chi vd. 2003; Furusawa vd. 2007; Maltese ve Bovo 2007; Bovo vd. 2011; Vendramin vd. 2013). Virus; beyin, medulla spinalis, optik sinir ve retinal dokulara affinite göstermektedir. Yapılan histolojik muayenelerde etkenin beyin ve retina dokularında vakuolleşmelere yol açtığı bu nedenle balıklarda anormal yüzme davranışları ve görme kaybı gibi sinirsel semptomların ortaya çıktığı bildirilmektedir (Nishizawa vd. 1997). Ayrıca betanodavirusların akuatik çevreye oldukça dirençli olduğu, hem tatlı su balıklarında hem deniz balıklarında enfeksiyona neden olabileceği bildirilmektedir (Vendramin vd. 2013). Etkenin tanısında Real Time RT-qPCR yöntemi ile viral nükleik asit tespitinin spesifitesinin diğer tanı yöntemlerine oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Anonim 2019).

Bu çalışmanın amacı, akvaryum balığı yetiştiriciliği fazlaca yapılan Koi (*Cyprinus carpio*) ve Japon Balığı (*Carassius auratus*) türlerinde

betanodavirus varlığının RT-qPCR yöntemi ile moleküler olarak araştırılmasıdır.

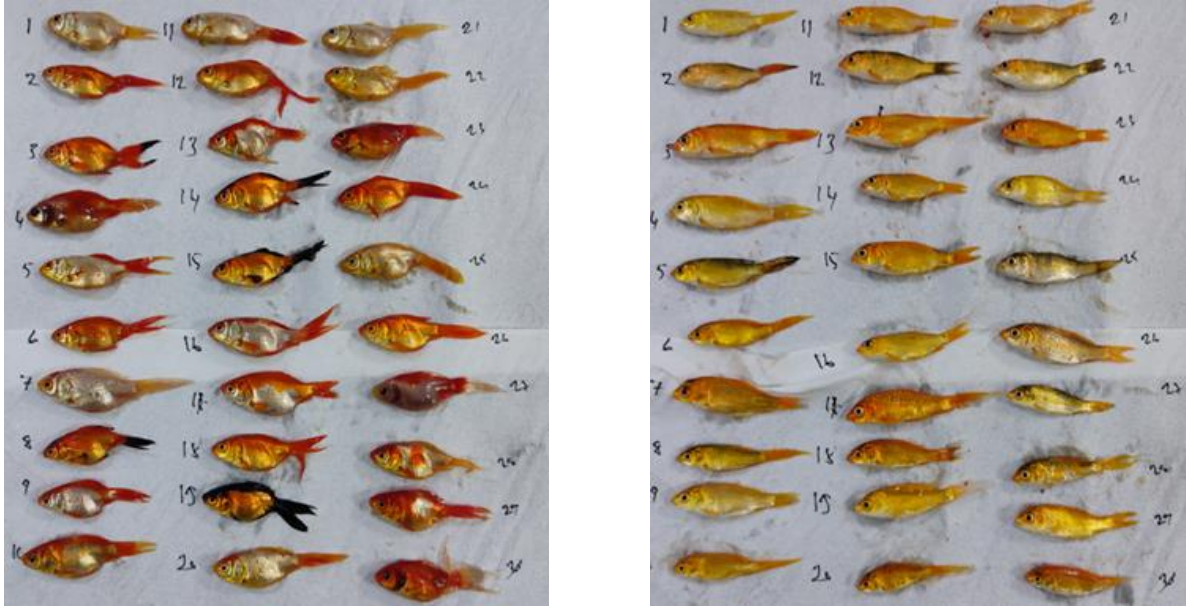
Materyal ve Metot

Örneklerin Temini

Araştırmada kullanılacak koi ve japon balığı türlerinden Antalya ilinde yetiştiricilik faaliyeti gösteren 3 farklı akvaryum işletmesinden her bir türden 30'ar adet olmak üzere toplamda 180 adet balık numunesi alınmıştır (Çizelge 1). Örneklerin alındığı işletmelere A, B ve C kodları, Japon balığı için 'J', Koi balığı için 'K' kodları verilmiştir. Örneğin; A işletmesinden alınan 10 numaralı Japon balığı numunesine verilen kod, AJ10 olarak oluşturulmuştur. Ayrıca balık refahı açısından çalışmaya başlamadan önce yerel etik komitesinden Etik Kurul onayı alınarak çalışmaya başlandı. Numune alırken özellikle anormal yüzme davranışı gösteren letarjik balıklar tercih edildi. Alınan balık numunelerinden Japon balıklarının ortalama boyu 7 cm, Koi balıklarının ise ortalama boyu 8 cm olarak ölçülerek kaydedildi. Numunelerin alındığı havuz sıcaklığı Koi balığı için 23 °C, Japon balığı için ise 24°C olarak kaydedilmiştir.

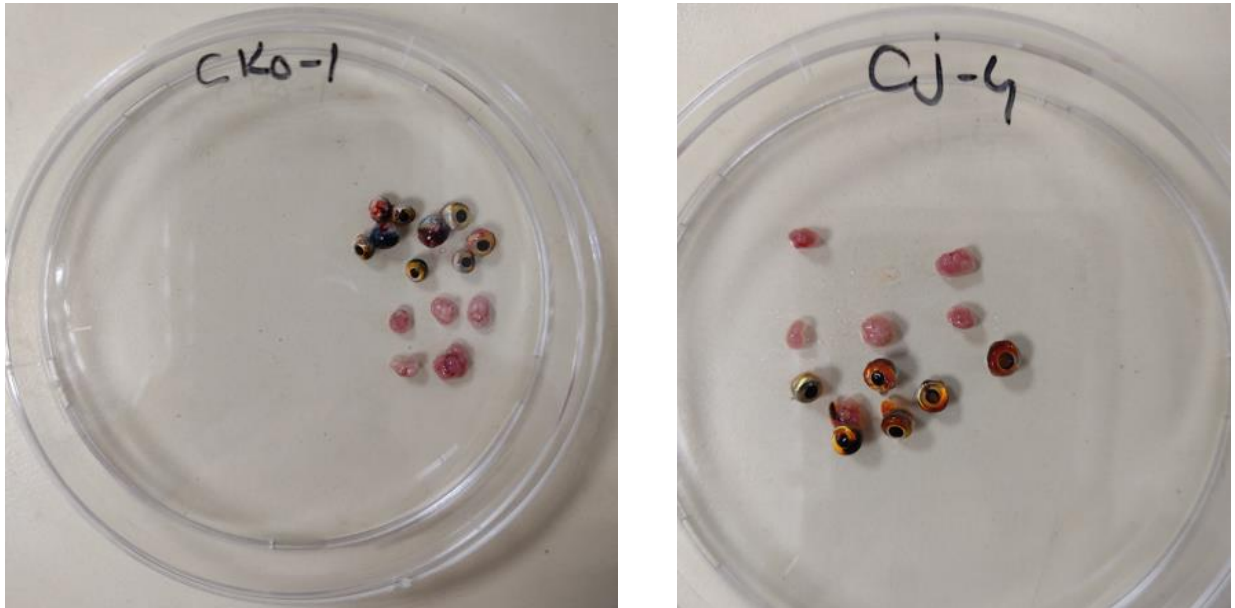
Örneklerin Hazırlanması

Uygun şartlarda alınan numunelere ötenazi (fenoksietanol) uygulanarak bilgiler kaydedildi (Şekil 1). Her 5 balık bir örnek olacak şekilde balıkların beyin ve gözleri alınarak steril petrilere konuldu (Şekil 2). Steril makas ve pensten oluşan set, her 5 balık için ayrı ayrı kullanıldı. Her bir petri kutusundaki numuneler steril kum ve daha önceden %2 fetal dana serumu – %1 antibiyotik antimikotik solüsyon ilave edilen glutaminli L-15 vasat kullanılarak homojenize edildi. Elde edilen homojenizatlara 3500 rpm'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Elde edilen süpernatantlar 0.45 µm filtreden geçirilerek 2 ml hacimli dondurma ampullerine taksim edilerek ekstraksiyon işlemi yapılanaya kadar -80°C'de stoklandı.



Şekil 1. Üç farklı yetiştirme işletmesinden alınan Koi (*Cyprinus carpio*) ve Japon balığı (*Carassius auratus*) numuneleri

Figure 1. Koi (*Cyprinus carpio*) and goldfish (*Carassius auratus*) samples from three different breeding farms



Şekil 2. Koi (*Cyprinus carpio*)'ye ait beyin ve göz organları (sol) ile Japon balığına (*Carassius auratus*) ait beyin ve göz organlarının steril petriye alınması (sağ).

Figure 2. Removal of brain and eye organs of Koi (*Cyprinus carpio*) (left) and brain and eye organs of goldfish (*Carassius auratus*) in sterile petri dishes (right).

Nükleik asit Ekstraksiyonu ve RT-qPCR

Nükleik asit ekstraksiyonunda, ticari ekstraksiyon kiti (MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, Roche, Germany) kullanılmış olup, ekstraksiyon işlemi otomatik ekstraksiyon cihazı (Roche MagNA Pure LC System) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda yapıldı.

Amplifikasyonda, ticari kit (Real Time Ready Virus Master, Roche, Germany) kullanıldı. OIE (2019)'nin önerdiği ve Panzarin (2010) tarafından geliştirilen, virusun RNA2 segmentinin T4 değişken

bölgesine göre (69bp) dizayn edilen **RNA2 FOR:** CAA-CTG-ACA-RCG-AHC-ACA-C, **RNA2 REV:** CCC-ACC-AYT-TGG-CVA-C ve **RNA2 Probe:** TYC-ARG-CRA-CTC-GTG-GTG-CVG primer prob setleri kullanıldı. Bu çalışmada, Panzarin ve ark. (2010) tarafından geliştirilen, Kaplan ve Karaoğlu (2021)'in laboratuvar ortamında optimize ettiği metod kullanılmıştır.

RNA ekstraksiyonu ve RT-qPCR işlemlerinde pozitif kontrol virus olarak Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Dipartimento di

Ittiopatologia, Italy'den sağlanan Balık Hastalıkları Ulusal Referans Laboratuvarı İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Viroloji Bölümü stoklarında bulunan referans betanodavirus suşu (475/198) kullanıldı.

Çizelge 1. Örnekleme yapılan yetiştirme tesisleri, örneklere ait bilgiler ve sonuçlar

Table 1. Sampling breeding facilities, information about the samples and the results

Sıra	İl/İlçe	İşletmeye Verilen Kod	Tür	Örnekleme Tarihi	Örnek Kodu	Örnek Sayısı	Sonuç
1	Antalya/Döşemealtı	A	Koi	20.12.2021	AK-1/30	30	Negatif
2	Antalya/Döşemealtı	A	Japon	20.12.2021	AJ-1/30	30	Negatif
3	Antalya/Serik	B	Koi	21.12.2021	BK-1/30	30	Negatif
4	Antalya/Serik	B	Japon	21.12.2021	BJ-1/30	30	Negatif
5	Antalya/Kepez	C	Koi	22.12.2021	CK-1/30	30	Negatif
6	Antalya/Kepez	C	Japon	22.12.2021	CJ-1/30	30	Negatif

Tartışma ve Sonuç

Son yıllarda gerek deniz kafes balıkçılığı gerekse tatlı su balığı yetiştiriciliği yapılan işletmelerde patojen viral etkenlerin neden olduğu hastalıklar daha çok ortaya çıkmaktadır. Bu durum karşısında koruyucu hekimlik uygulamaları dünden bugüne daha fazla önem arz etmektedir.

Viral Nervöz Nekrozis hastalığı, larval dönemdeki ve juvenil diye adlandırılan yavru balıklarda % 100'e varan mortalite oranı ile özellikle deniz balıklarında ölümlere neden olmaktadır. Dünyada hızla yayılım gösteren *betanodavirus* salgınları son yıllarda ülkemizde de yetiştiricilik tesisleri ile kuluçkahanelerde de görülmeye başlamıştır (Kalaycı vd. 2016; Kaplan ve Karaoğlu 2021; Kaplan vd. 2021; Kaplan vd. 2022).

Ülkemizde 2011 yılında Mersin'de kültürü yapılan bir levrek işletmesinde *betanodavirus*'a ilk kez rastlanılmıştır (Özkan Özyer vd. 2014). Ege bölgesinde faaliyet gösteren levrek kuluçkahanesinden ise 2014 yılında VNN hastalığının belirtilerini gösteren balıklar örneklenmiş ve bu balıklarda da *betanodavirus* pozitifliği tespit edilmiştir (Kalaycı vd. 2016). Akdeniz bölgesinde bulunan bir kuluçkahane levreklerde *betanodavirus*'a rastlanılmış olup yapılan filogenetik analiz sonucu virusun RGNNV genotipi olduğu tespit edilmiştir (Kaplan ve Karaoğlu 2021). Karadeniz bölgesinde ise levreklerde tespit edilmiş ve yine RGNNV genotipi olduğu belirlenmiştir (Kaplan vd. 2021). Ege bölgesinde çiftlik şartlarında yetiştiricilik yapan bir işletmede ise çipura türü balıklarda *betanodavirus* tespit edilmiş olup ilk kez reasortant bir suşa (RGNNV/SJNNV) rastlanılmıştır (Kaplan vd. 2022).

Hindistan'da 2006 yılında yapılan bir araştırmada asemptomatik Japon balıklarında (*Carassius auratus*) *betanodavirus* tespit edilmiştir (Jithendran vd. 2011). Asya ülkelerinde akvaryum

Bulgular

İncelemesi yapılan her iki türe ait (Japon balığı ve Koi balığı) toplam 180 balık numunesinde *betanodavirus* RNA'sı tespit edilmemiştir (Çizelge 1).

balığı olarak yetiştirilen medaka türü (*Oryzias latipes*) balıkların da yapılan araştırmalarda *betanodavirus*'a karşı duyarlı olduğu ve virusa maruz bırakılan balıklarda klinik semptomların gözlemlendiği tespit edilmiştir (Furusawa vd. 2006). Son yıllarda yapılan çalışmalarda *betanodavirus*'ların tatlı su türlerinde de birçok araştırmacı tarafından bildirilmiş olması, araştırmaların bu yönde de yapılması gerektiği kanısını güçlendirmektedir (Keawcharoen vd. 2015; Bandín ve Souto 2020). Tatlı su türlerinden Rus Karaca Mersin balığı (*Acipenser gueldenstaedtii*), Yılan balığı (*Anguilla Anguilla*), Japon balığı (*Carassius auratus*), Lepistes (*Poecilia reticulata*), Tilapya (*Oreochromis niloticus*) ve Yayın balığı (*Parasilurus asotus*) gibi türlerde *betanodavirus* tespit edilmiştir (Chi vd. 2003; Athanassopoulou vd. 2004; Bigarré vd. 2009; Jithendran vd. 2011; Bandín ve Souto 2020). Ayrıca suyun tuzluluk oranının hastalığın ortaya çıkışı ya da viral replikasyonda herhangi bir bağlantısının olmadığı da bildirilmektedir (Bovo vd. 2011). Bu durum her ne kadar *betanodavirus*'ların deniz balıklarında daha çok görülse de tatlı su türlerinin de enfeksiyona açık olduğunu ve yeni türlerde de yayılım gösterebileceğini desteklemektedir. Su sıcaklığı ve balık türlerinin çeşitliliği konakçı durumunu doğrudan etkilemekte ve farklı genotiplerin ortaya çıkmasına ve hatta reasortant suşların (RGNNV/SJNNV, SJNNV/RGNNV) da salgınlara neden olabileceğini göstermektedir (Toffan vd. 2017, Panzarin vd. 2012). Virusun genomunun segmentli yapısı türler arasında mutasyona sebebiyet verip, virusun yeni balık türleri için de tehdit olabileceğini düşündürmektedir (Hegde vd. 2003). *Betanodavirus* salgınlarının deniz balıklarının yanı sıra son yıllarda tatlı su türlerinde de görüldüğü bildirilmektedir (Hegde vd. 2003; Gomez vd. 2006). Bu sebeple hem deniz balıklarında hem de

tatlı su türlerinde daha çok araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Son otuz yıl içinde betanodaviruslar ile ilgili çok fazla araştırma makalesi yayımlanmıştır. Ancak; virüs konakçı ilişkileri, türler arasında genotipik değişimler, çevresel koşullar, hastalığın yayılımı ve küresel ısınmanın da virusun epidemiyolojisine etkisi de dahil çok fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Bandín ve Souto 2020). Giderek daha geniş coğrafyalarda yayılım gösteren *betanodavirus* enfeksiyonlarının sadece deniz balıklarında değil, tatlı su yetiştiriciliği yapılan kuluçkahane ve tesislerde de tespit ediliyor olması araştırma çalışmalarının bu yönleri de evrilmesi gerektiğini göstermektedir. Ornamantel balıklar olarak adlandırılan tatlı su akvaryum türlerinin kısıtlı, dar ve küçük kapasiteli alanlarda farklı türlerin yakın ilişkide olduğu düşünüldüğünde *betanodavirus* gibi birçok viral hastalığın bulaşması daha kolay olacaktır. Bu sayede virusa duyarlı olan türlere yeni türlerin eklenmesi de kaçınılmaz olacaktır.

Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye’de akvaryum balıklarında *betanodavirus* varlığı ilk kez araştırılmıştır ve 3 farklı akvaryum balığı yetiştiren işletmeden alınan koi ve japon balığı türlerinde *betanodavirus* tespit edilmemiştir. Akvaryum balıklarının *betanodavirus* epidemiyolojisindeki rollerinin daha iyi anlaşılması için, ileride farklı türleri de içeren daha geniş çalışmaların yapılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

Anonim, 2019. Viral encephalopathy and retinopathy. OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals Chapter 2.3.12.

Athanassopoulou F, Billinis C, Prapas T. 2004. Important disease conditions of newly cultured species in intensive freshwater farms in Greece: first incidence of nodavirus infection in *Acipenser* sp. Dis. Aquat. Org. 60(3), 247-252.
doi:10.3354/dao060247

Bandín I, Souto S, 2020. Betanodavirus and VER Disease: A 30-year Research Review. Pathogens.9(2):106.
doi:10.3390/pathogens9020106

Bigarré L, Cabon J, Baud M, Heimann M, Body A, Lieffrig F, Castric J. 2009. Outbreak of betanodavirus infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in fresh water. J Fish Dis. 32(8), 667-673.
doi: 10.1111/j.1365-2761.2009.01037.x.

Bovo G, Gustinelli A, Quaglio F, Gobbo F, Panzarin V, Fusaro A, Mutinelli F, Caffara M, Fioravanti ML. 2011. Viral encephalopathy and retinopathy outbreak in freshwater fish farmed in Italy. Dis. Aquat. Org., 96,45-54.
https://doi.org/10.3354/dao02367

Chi SC, Shieh JR, Lin SJ. 2003. Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic

organisms in Taiwan. Dis. Aquat. Org. 55(3), 221-228.
doi:10.3354/dao055221

Dalla Valle L, Zanella L, Patarnello P, Paolucci L, Belvedere P, Colombo L. 2000. Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. J Fish Dis. 23, 321-327.
doi: 10.1046/j.1365-2761.2000.00255.x.

Furusawa R, Okinaka Y, Nakai T. 2006. Betanodavirus infection in the freshwater model fish medaka (*Oryzias latipes*). J Gen Virol. 87(8), 2333-2339.
doi: 10.1099/vir.0.81761-0.

Furusawa R, Okinaka Y, Uematsu K, Nakai T. 2007. Screening of freshwater fish species for their susceptibility to a betanodavirus. Dis. Aquat. Org. 77,119-125.
doi: 10.3354/dao01841.

Gomez DK, Lim DJ, Baeck GW, Youn HJ, Shin NS, Youn HY, Hwang CY, Park JH, Park SC. 2006. Detection of betanodaviruses in apparently healthy aquarium fishes and invertebrates. J Vet Sci. 7(4), 369-374.
doi: 10.4142/jvs.2006.7.4.369.

Hegde A, The HC, Lam TJ, Sin YM. 2003. Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poecilia reticulata* – comparative characterization and pathogenicity studies. Arch Virol. 148: 575-586.

Iwamoto T, Nakai T, Mori K, Arimoto M, Furusawa I. 2000. Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. Dis. Aquat. Org. 43, 81–89.
doi:10.3354/dao043081.

Jithendran KP, Shekhar MS, Kannappan S, Azad IS. 2011. Nodavirus infection in freshwater ornamental fishes in India: diagnostic histopathology and nested RT-PCR. Asian Fisheries Science (24) :12-19.

Kalaycı G, Özkan B, Pekmez K, Kaplan M. 2016. Levrek ve Çipura kuluçkahanelerinde Viral Nervöz Nekrozis Hastalığının Durumu. XII. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi Poster Sunumu. Kapadokya/Nevşehir, 30 Ağustos - 02 Eylül 2016. (in Turkish)

Kaplan M ve Karaoğlu MT. 2021. Investigation of betanodavirus in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at all production stages in all hatcheries and on selected farms in Turkey. Arch. Virol. 166(12), 3343-3356.

Kaplan M, Pekmez K, Özkan B, Çağırğan A. A, Kalaycı G, 2021. Detection of RGNNV genotype betanodavirus in the Black Sea and monitoring studies. Dis. Aquat. Org. 144, 117-121.

Kaplan M, Pekmez K, Çağırğan AA, 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. J Fish Dis.

Keawcharoen J, Techangamsuwan S, Ponpornpisit A, Lombardini ED, Patchimasiri T, Pirarat N. 2015. Genetic characterization of a betanodavirus isolated from a clinical disease outbreak in farm-raised tilapia *Oreochromis niloticus* (L.)

- in Thailand. *J Fish Dis.* 38(1), 49-54.
doi: [10.1111/jfd.12200](https://doi.org/10.1111/jfd.12200).
- Kılıçerkan M ve Çek Ş. 2011. Hatay ilçelerindeki akvaryum işletmelerinin genel profili'nin çıkarılması üzerine bir araştırma. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 1(4), 77-82. (in Turkish)
- Maltese C ve Bovo G. 2007. Viral encephalopathy and retinopathy. *İttopatologia.* 4: 93-147.
- Mushiaki K, Nishizawa T, Nkai T, Furusawa I, Muroga K. 1994. Control of VNN in Striped Jack: Selection of Spawners Based on the Detection of SJNNV Gene by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Fish Pathology*, 29 (3) 177-182.
doi: [10.3147/jsfp.29.177](https://doi.org/10.3147/jsfp.29.177).
- 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.
- Nishizawa T, Furuhashi M, Nagai T, Nakai T, Muroga K. 1997. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Applied and environmental microbiology*, 63(4), 1633-1636.
doi: [10.1128/aem.63.4.1633-1636.1997](https://doi.org/10.1128/aem.63.4.1633-1636.1997).
- OIE 2019. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Section 2.3. Diseases of Fish. Chapter 2.3.12 Viral encephalopathy and retinopathy.
- Özkan Özyer B, Kalaycı G, İnçoğlu Ş, Pekmez K, Küçükali Y. 2014. The first isolation of betanodavirus from cultured seabass in Turkey. *Bornova Veteriner Bilimleri Dergisi*, 36(50), 13-17.
- Pala S ve Yılmaz E. 2020. Ordu İlinde Akvaryum Sektörünün Mevcut Durumu, Sorunları ve Çözüm Önerileri. *Acta Aquatica Turcica*, 16(3), 387-395.
- 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. *Arch Virol.* 155:1197-1203.
doi: [10.1007/s00705-010-0701-5](https://doi.org/10.1007/s00705-010-0701-5).
- Panzarin V, Fusaro A, Monne I, Cappelozza E, Patarnello P, Bovo G, Cattoli G. 2012. Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. *Infect Genet Evol.* 12(1), 63-70.
doi: [10.1016/j.meegid.2011.10.007](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.
- Toffan A, Pascoli F, Pretto T, Panzarin V, Abbadi M, Buratin A, 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.
doi: [10.1038/srep46755](https://doi.org/10.1038/srep46755)
- Vázquez-Salgado L, Olveira JG, Dopazo CP, Bandín I. 2020. Role of rotifer (*Brachionus plicatilis*) and Artemia (*Artemia salina*) nauplii in the horizontal transmission of a natural nervous necrosis virus (NNV) reassortant strain to Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Veterinary Quarterly*, 40(1), 205-214.
doi: [10.1080/01652176.2020.1810357](https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1810357).
- Vendramin N, Patarnello P, Toffan A, Panzarin V, Cappelozza E, Tedesco P, Terlizzi A, Terregino C, Cattoli G. 2013. Viral retinopathy in groupers (*Epinephelus* spp.) in southern Italy: a threat for wild endangered species? *BMC Vet. Res.* 9,20