

**REAL-TIME PCR KULLANILARAK İKİ AMFİBİ PATOJENİNİN
(*BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS* ve *RANAVIRUS*)
ARAŞTIRILMASI**

Hacer ÖZUSLU

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

Afyonkarahisar

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MEDİKAL BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

REAL-TIME PCR KULLANILARAK İKİ AMFİBİ PATOJENİNİN
(*BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS* ve *RANAVIRUS*)
ARASTIRILMASI

Hazırlayan
Hacer ÖZUSLU

Danışman
Prof.Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

AFYONKARAHİSAR

Bu tez Çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir. Proje No: “19.SAĞ.BİL.16”

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

... / 06 / 2022

İmza

Hacer ÖZUSLU

ÖZET

REAL-TİME PCR KULLANILARAK İKİ AMFİBİ PATOJENİNİN (*BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATİDİS* ve *RANAVİRUS*) ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada, Türkiye'de yaşamakta olan amfibi türleri üzerinde IUCN (İnternational Union for Conservation of Nature) kriterleri doğrultusunda Nesli Tükenmekte Olan Türler kategorisinde Red Listte endemik olan Tavass Kurbağasının(*Rana tavasensis*) azaldığı bilinmekte, bireyleri üzerinde Real time PCR tekniği kullanılarak ölümcül hastalıklarla ilişkili olduğu bilinen amfibi patojenleri *Batrachochytrium dendrobatidis* ve poikilotherm hayvanlara rahatlıkla bulaşabilmekte olan *Ranavirus* [*Frog virus (FV-3)*] genom equivalentlerine ait primerler yardımıyla varlık veya yokluğu üzerinde inceleme yapılmıştır.

Araştırma sonucu olarak amfibi türleri üzerinde yok oluşlardan sorumlu olarak kabul edilen iki önemli patojen; *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) fungusu ve *Ranavirus* (*Iridoviridae*)'ün ülkemiz de endemik tür, Tavass Kurbağası (*Rana tavasensis*) bireylerinde tespit edilmiştir.

Ülkemizin biyoçeşitliliğin de önemli yeri olan kuyruksuz türlerin nesillerinin azaldığını ve tükenme tehlikesinde oldukları ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Chytridiomycosis, *Batrachochytrium dendrobatidis*, Ranavirüs, *Rana tavasensis*

SUMMARY

INVESTIGATION OF TWO AMPHIBIAN PATOGENS USING REAL-TIME PCR

In this study, the endemic derivatives Frog (*Rana panasisis*), which is in the Red List of the IUCN (National Union for Conservation of Nature) on the things that are living in Turkey and it is under construction, on what has actually been done - over time. related amphibian tracers *Batrachochytrium* *Batrachochytrium* (Frog virus) [Frog virus [Frog virus] images showing absence on or on primers of their equivalents on the genome.

Two main pathogens considered responsible for extinction on amphibians as a research process; *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) fungus and endemic species of *Ranavirus* (Iridoviridae), Pan-Frog (*Rana Tavasensis*) were detected.

It reveals itself to be unable to meet a high level of biodiversity.

Keywords: Chytridiomycosis, *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Ranavirus*, *Rana tavasensi*

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	I
SUMMARY.	II
ÖNSÖZ	III
İÇİNDEKİLER.	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER	VII
ÇİZELGELER	VIII
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	4
2.1. Ranavirüs... ..	4
2.1.1 Ranavirüs Virion Yapıları ve Sitopatolojileri.....	6
2.1.2 Ranavirüslerin Genomik Özellikleri.....	16
2.1.3 Ranavirüslerin Fizikokimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	17
2.1.4 Ranavirüslerin Nükleik Asit Özellikleri... ..	17
2.1.5 Ranavirüslerin Protein Özellikleri... ..	20
2.1.6 Ranavirüslerin Lipid Özellikleri.....	25
2.1.7 Ranavirüslerin Karbonhidrat Özellikleri	25
2.1.8 Ranavirüslerin Genom Organizasyonu ve Replikasyonu... ..	25
2.1.9 Ranavirüslerin Antijenlik Özellikleri... ..	29
2.1.10 Ranavirüslerin Epidemiyolojisi	29
2.1.11 Ranavirüs Salgınlarına İlişkin Açıklamalar.....	34
2.1.12 Tespit Yanlılıkları.....	34
2.1.13 Mevsimsel Girişler ve Ranavirüs Enfeksiyonunun Sıklığı.....	35
2.1.14 Geliştirme Boyunca Duyarlılık.....	36
2.1.15 Ranavirüslerde Alt Aile Sınır Kriterleri	37
2.1.16 Ranavirüslerde Cins Sınır Kriterleri	37
2.1.17 Ranavirüslerde Aile İçi Filogenetik İlişkiler	38

2.2. Chytridiomycosis ve Batrachochytrium Dendrobatidis40

2.2.1 B.Dendrobatidis Familyası	47
2.2.2 B.Dendrobatidis Yaşam Döngüsü	47
2.2.3 B.Dendrobatidis Kökeni	49
3. METARYAL ve METOT	51
3.1. Rana Tavasensis Arazi Çalışmaları	51
3.2. Örnekleme	53
3.3. Laboratuvar Analizleri.....	54
3.4. Elektroforez İşlemi	54
3.5. Qbit Ölçümleri.....	54
3.6. B.Dendrobatidis İçin DNA İzolasyonu	54
3.7. Ranavirüs için DNA İzolasyonu.....	55
4. BULGULAR	56
4.1 Real Time PCR İşlemleri.....	56
4.1.1 Real Time PCR ile B.Dendrobatidis Tespiti.....	56
4.1.2 Real Time PCR ile Ranavirüs [Frog Virus (FV-3)] Tespiti	59
4.2. Rana Tavasensis (TavasKurbağası).....	61
4.3.Ranavirus Frog-virus(FV-3)	69
5. TARTIŞMA.....	70
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
7. KAYNAKLAR.....	74
8. EKLER	95
8.1. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI.....	95
9.ÖZGEÇMİŞ.....	96

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%: Yüzde

B.Ç. : Biyoçeşitlilik

BD : Batrachochytrium dendrobatidis

RV : Ranavirus

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1: Zarflı ve zarfsız ranavirüs virion yapısı.....	7
Şekil 2.2: Ranavirüslerin replikasyon döngüsünün özeti	11
Şekil 2.3:İridoviridae Kurbağa virüsü 3'ün (FV3) çoğaltma stratejisi	26
Şekil 2.4: Iridoviridae FV3 ile enfekte olmuş bir yağ kafasının transmision elektron mikrofrafisi	27
Şekil 2.5:Iridoviridae : Iridoviridae familyasının filogenetik analizi	38
Şekil 2.6:B. dendrobatidis patojenin yıllara bağlı olarak küresel dağılışı haritası.42	42
Şekil 2.7:B. dendrobatidis patojenin global dağılım haritası	43
Şekil 2.8:B.dendrobatidis için öngörülen temel ekolojik niş haritası. Koyu bölgeler B. dendrobatidis ekolojik niş alanı için uygun olan bölgeler.....	44
Şekil 2.9:Bulaşıcı ve sesil büyüme aşamalarını gösteren Batrachochytrium dendrobatidis'e ait yaşam döngüsü.....	48
Şekil 3.1: Rana tavasensis dağılım arenası.....	50
Şekil 3.2: Kuyruksuz kurbağa türü Rana tavasensis (Tavas kurbağası).....	51
Şekil 4.1: Tavas kurbağası bireylerinin yakalandığı lokatileteler... ..	60
Şekil 4.2: 2017-2018-2019 yıllarına ait R. tavasensis populasyonlarında B. dendrobatidis patojenin varlık/yokluk dağılım grafiği: 1-Tavas Çamlaraltı,2-İnceler.....	61
Şekil 4.3: R. tavasensis türüne ait örnekleri gösteren lokalite haritası: 1-Tavas Çamlaraltı, 2-İnceler.....	62
Şekil 4.4: Rana tavasensis populasyonlarında B. dendrobatidis patojenin hava sıcaklığına bağlı yaygınlık frekans grafiği.....	62
Şekil 4.5. Rana tavasensis populasyonlarında B. dendrobatidis patojenin neme bağlı yaygınlık.....	63
Şekil 4.6: Rana tavasensis populasyonlarında B. dendrobatidis patojenin pH değerine bağlı yaygınlık frekans grafiği.....	63
Şekil 4.7:Türe özgü lokalitelere bağlı Bayesian enterpolasyonu ile Yoğunluk, GE, ENU mekânsal dağılım analiz haritası.....	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1: İridoviridae. Iridoviridae familyasının özellikleri.....	14
Çizelge 2.2: Ranavirüslerdeki kodlanan protein örnekleri ve onların tahmin edilen görevleri.....	17
Çizelge 2.3: İridoviridae Iridovirus genom içeriği.....	19
Çizelge 2.4: Iridoviridae. Aile üyelerinin çekirdek genler Iridoviridae	22
Çizelge 3.1: Çalışmada değerlendirilen toplanan. <i>Rana tavasensis</i> örneklere ait eşey sayıları... ..	52
Çizelge 4.1: Standart örneklerin hazırlanması... ..	55
Çizelge 4.2 <i>B. dendrobatidis</i> türüne ait spesifik primerler.....	56
Çizelge 4.3: Bd tespiti için yapılan qPCR için kullanılmış olan malzeme miktarları. 57	
Çizelge 4.4: Bd tespiti için qPCR amplifikasyon protokolü (PrimerDesign, İngiltere)... ..	58
Çizelge 4.5: Ranavirus (FV-3) tespitinde kullanılan primer dizileri	59
Çizelge 4.6: Ranavirus (FV3) tespiti için qPCR amplifikasyon protokolü	59
Çizelge 4.7: Lokalitelere göre <i>Rana tavasensis</i> türüne ait <i>B. dendrobatidis</i> patojenin varlığı, +Bd: pozitif... ..	61
Çizelge 4.8: Türe ait popülasyonlarda genomik equvanat (GE) dağılım	64
Çizelge 4.9: PCA analizi sonucu ekolojik parametrelere eigenvalue, varyans ve kümülatif varyans değerler	64
Çizelge 4.10. Eksenler ile ekolojik parametreler (değişkenler) arasındaki korelasyon (Pearson ve Kendall) katsayısı (r) değerleri (N=29).....	65
Çizelge 4.11: <i>B. bombina</i> türüne ait popülasyonlarda MCP ve IE primerleri göre Ranavirüs patojenin varlığı.....	68
Çizelge 6.1: Türkiye'deki Bd çalışmaları.....	71

1. GİRİŞ

Biyçeşitlilik terimi; biyolojik çeşitlilikten gelir, genlerden ekosistemlere kadar dünyadaki tüm düzeylerdeki yaşam çeşitliliğini ifade eder ve yaşamı sürdüren evrimsel, ekolojik ve kültürel süreçleri kapsayabilir. Biyçeşitlilik; tek hücreli yaşam formlarından çok kompleks büyük yaşam formlarına kadar yeryüzündeki tüm canlılar aleminin gerek genetik çeşitliliklerini gerekse yaşadıkları ortamları (yaşam birliği- ekosistem çeşitliliği) kapsayarak tanımlamakta ve değerlendirmektedir.

Biyçeşitlilik, sadece ender, tehdit ya da tehlike altında olduğunu varsaydığımız türleri değil, aynı zamanda da insanlardan mikroplar, mantarlar ve omurgasızlar gibi hakkında pek az bilgi sahibi olduğumuz organizmalara değin her canlıyı kapsamaktadır.

Ülkemizin konumu büyük ölçekte önemli bir biyçeşitliliğe ev sahipliği yapmakta olduğunu açıklamaktadır. Türkiye bulunan çok sayıda endemik bitki ve hayvan türü sayesinde de gen havuzu bakımından oldukça büyük stratejik öneme sahiptir. Türkiye, Avrupa kıtasından daha fazla tür çeşitliliğine ve endemizme sahip bir ülkedir. Ülkemizde 11 bine yakın bitki türüne ve çeşitliliğine sahip olmasıyla en zengin üç bölgenin kesişiminde yer almaktadır.

Biyçeşitliliğin bir parçası olarak biz insanlar da neslimizin devamlılığı için doğayı korumamızı gerektiğinin bilincinde olmalıyız. 80'li yılların başlarında temeli atılmış olan Koruma Biyolojisi, çeşitli bilim dallarıyla birlikte multidisipliner bir çalışma perspektifiyle biyçeşitliliği inceleyen, belgelenmesi ve korunmasına ilişkin her türlü faaliyeti ele alan bir bilim dalı olarak gelişme göstermiştir. Koruma biyolojisi, biyçeşitliliğin beşeri faaliyetler sonucunda oluşan ve oluşmakta olan tehlikeleri belirler ve biyçeşitliliği korumak ve onarmak amacıyla yöntemler geliştirir. Ender türlerin ve özellikle de bu türlerin yaşam alanları (habitat) ile beraber korunması için programlar geliştirilmesini ve yerli halkın uzlaşmasıyla programlara katılımı sağlamaya yönelik çalışmalar yürütmektedir. Nesli yok olma tehlikesi altında olan çok sayıda tür yaşam alanlarının tahribatı, aşırı avlanma ve gereğinden fazla tüketim sebebiyle ani yok oluşlarla karşı karşıya kalmaktadır.

IUCN (Dünya Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği), tanımlanmış türlerin kabaca yüzde 3'ünü değerlendirmiş ve dünya çapında 16 bin 928 türün neslinin tükenme tehdidi altında olduğunu belirlemiştir. Net olarak bildiğimiz tek şey ise; önümüzdeki yıllarda, binlerce türün sonsuza dek ortadan kaybolma riskiyle karşı karşıya olmasıdır.

Özetle bahsedilen bu etkiler ile gün geçtikçe Dünya ve Türkiye Biyoçeşitliliğini tehlike altına almaktadır ve dünya üzerinde pek çok canlının yok oluş süreci başlamaktadır. Ülkemizde çevre kirliliği, ticari amaçlı bilinçsiz toplanma, yanlış zirai ilaç kullanımı, ekolojik ve ekonomik bakımdan ülkemiz için önemli katkıları bulunan amfibi türlerinde azalmaya neden olmaktadır. Dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından yapılan bir açıklamada Yaban Hayat Hastalıkları Listesi (WLDL)'de amfibi türlerinin yok olmasına sebep olan iki önemli patojen; *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) fungusu ve Ranavirüs (İridoviridae) hakkında yeterli donanımda bilgi ve açıklayıcı araştırma verisi bulunmamaktadır.

Amfibi patojeni olarak bilinen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), chytridiomycosis adı verilen bulaşıcı bir hastalığa neden olur. Birçok amfibi türünü etkileyen bu patojen, ilk olarak Güney Yarımküre'de ortaya çıkan ve küresel ticaret yollarıyla yayılan istilacı bir mantardır. İklim değişikliği Kuzey Yarımküre'de yayılmasını hızlandırıyor. Dünya çapında 200'den fazla amfibi, patojenlerin etkisi altındadır ve bu türün azalma riski altında olduğu bilinmektedir. 1998 yılında Berger ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada dünya genelinde amfibi türlerinde küresel toplu ölümlere sebep olduğu bilinen söz konusu patojen fungusu ilk olarak Panama ve Avusturalya'da amfibi türlerindeki ani azalışın sebebi olarak gösterilmiştir. Aynı çalışmada patojenin kökeninin Güney Afrika Cape Town Müzesi'ndeki (SAMZR) 1938 yılı kayıtlı *Xenopus leavis* örnekleri incelenerek anlaşılmıştır (Weldon, 2014).

Çeşitli araştırmalar sonucu patojenin başta iklim değişikliği olmak üzere global ticaret yolları ile yayıldığı, Afrika, Güney Amerika, Kuzey Amerika, Avrupa, Asya ve Yeni Zelanda'da 287 amfibi türünde ve 25 familyasında *B. Dendrobatidis* tespit edilmiştir (Bosch, 2007; Krigger, 2009).

Dünya Sağlık Örgütü'nün Yaban Hayat Organizasyonu (Worlds Organisation for Animal Health) tarafından 2008 yılında Yaban Hayat Hastalıkları Listesine (WLDL) gösterilen, yüksek ölüm riski taşıyan salgın hastalıklar grubunda anılan ranaviral hastalıkları bulaştırıcı, Ranavirüs türleri, İridoviridae familyasına dahildir. Ranavirüsler sürüngenler ve balıklar üzerinde de amfibilerde olduğu gibi sistemik enfeksiyonlara ve ölümlere sebep olmaktadır. Kurbağa virüs-3 [Frog virüs (FV-3)], Bohle virüs (BIV), Epizootic haematopoietic necrosis virüs (EHNV) türleri de amfibiler üzerinde viral hastalıklara sebep olmaktadır. Bahsi geçen virüs türlerinin en önemli özelliği genomunda major capsid proteini (MCP) bulundurmalarıdır.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1. Ranavirus

Rana, 1960'larda Kuzey leopar kurbağasından (*Lithobates pipiens*) bir Ranavirüsün ilk izolasyonunu yansıtan Latince "kurbağa" kelimesinden türetilmiştir. Ranavirus, Iridoviridae ailesindeki bir virüs cinsidir. Cins aşağıdaki türleri içerir, bunlar; *Ambystoma tigrinum* virüsü, Ortak Ebe Kurbağa Virüsü, Epizootik Hematopietik Nekroz Virüsü, Avrupa Kuzey Atlantik Ranavirüsü, Kurbağa Virüsü 3, Santee-Cooper Ranavirüsü, Singapur Orfoz İridovirüs olarak tanımlanmıştır.

Iridoviridae familyası, Chloriridovirus, Iridovirus, Lymphocystivirus, Megalocytivirus ve Ranavirus olmak üzere yedi cinse ayrılmaktadır. Ranavirus cinsindeki amfibileri enfekte ettiği bilinen üç virüs içermektedir (*Ambystoma tigrinum* virüsü (ATV), *Bohle iridovirus* (BIV) ve kurbağa virüsü 3). Iridoviridae ailesi içinden Ranavirus, amfibi ve sürüngenler üzerinde bulaşıcı etkisi olan virüslerden sadece bir tanesini oluşturmaktadır. Bu familya içerisinde, Lymphocystivirus ve Megalocytivirus ile birlikte teleost balıkları enfekte eden üç ayrı cinsten bir tanesini ifade etmektedir. Iridoviridae familyası Ranavirüsler beraberindeki 4 genus içermektedir; Iridovirus, Chloriridovirus, Lymphocystivirus ve Megalocytivirus (Janccouich, 2001).

Ranavirüslerin bilinen 6 türü bulunmaktadır, *Ambystoma tigrinum* virüs (ATV), *Bohle iridovirüs* (BIV), Epizootic haematopoeitic necrosis virüs (EHNV), European catfish virüs (ECV), Frog virüs 3 (FV-3) ve Santee-Cooper ranavirüs (SCRV) uluslararası virüs taksonomi topluluğu (ICTV) tarafınca izolatlar olarak bildirilmiştir. Ranavirüsler, Megalocytivirüslerin de olduğu gibi, birçok çeşitli vahşi ve kültürlü tatlı ve tuzlu su balıklarında sistemik enfeksiyonlara neden olan yakın ilişkili dsDNA virüslerinin gelişmekte olan bir grubu olarak bilinmektedir. Megalocytivirüslerin de olduğu gibi, Ranavirüs salgınları bu yüzden su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli ekonomik öneme sahiptir, çünkü epizootikler orta derecede balık kaybına veya kültür balıklarında kitlesel ölüm olaylarına sebep olabilmektedir. Bunun yanı sıra, Megalocytivirüs'den farklı olarak, amfibilerde tespit edilen Ranavirüs enfeksiyonları, amfibi popülasyonları üzerinde gözlenen küresel yok oluşa sebep bulunan bir diğer faktör olarak gösterilmiştir.

Ranavirüslerin bulaşmasının, kontamine toprak, doğrudan temas, su yoluyla maruz kalma ve predasyon, nekrofaji veya yamyamlık sırasında enfekte olmuş dokuların yutulması dahil olmak üzere birçok yolla gerçekleştiği düşünülmektedir. Ranavirüsler, su ortamlarında nispeten stabildir ve konakçı organizmanın dışında birkaç hafta veya daha uzun süre devam eder.

Asya, Avrupa, Kuzey Amerika ve Güney Amerika'da Ranavirüsün sebep olduğu amfibi toplu ölümleri rapor edilmiştir. Ranavirüsler, Avustralya'daki vahşi amfibi popülasyonlarından izole edilmiştir, ancak bu kıtada toplu ölümle ilişkilendirilmemiştir.

Ranavirüs Diğer Konakları;

Yeşil pitonlar (*Chondropython viridis*)

Birman yıldız kaplumbağaları (*Geochelone platynota*)

Leopar kaplumbağası (*Geochelone pardalis*)

Gopher kaplumbağaları (*Gopherus polyphemus*)

Dağ kertenkelesi (*Lacerta monticola*)

Doğu kutu kaplumbağaları (*Terrapene carolina carolina*)

Florida kutu kaplumbağaları (*Terrapene carolina bauri*)

Batı süslü kutu kaplumbağaları (*Terrapene ornata*)

Mahmuzlu kaplumbağa (*Testudo graeca*)

Hermann'ın kaplumbağaları (*Testudo hermanni*)

Mısır kaplumbağaları (*Testudo kleinmanni*)

Rus kaplumbağaları (*Testudo horsfieldii*)

Marjinal kaplumbağalar (*Testudo marginata*)

Kırmızı kulaklı sürgüler (*Trachemys scripta elegans*)

Ortak kapan kaplumbağaları (*Chelydra serpentina*)

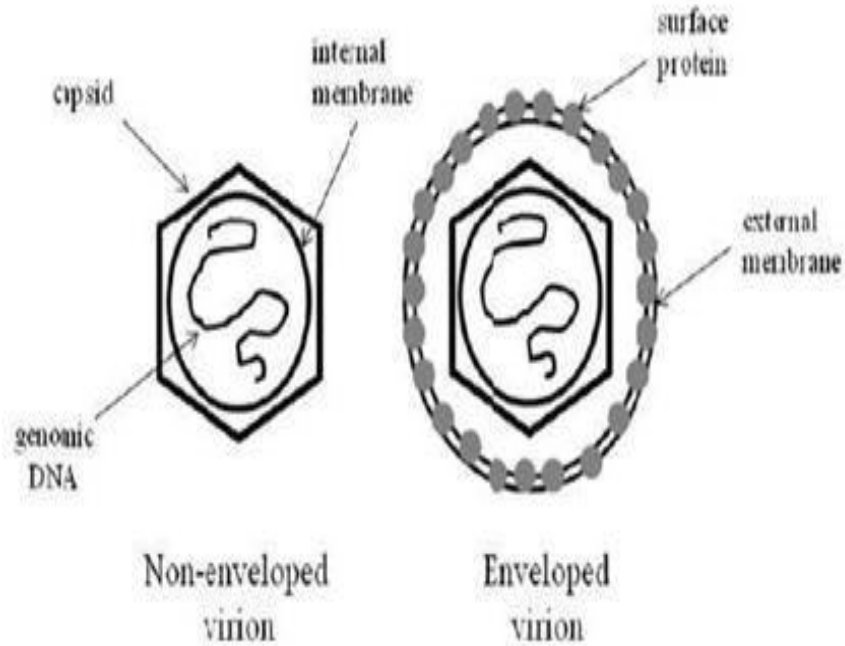
Çin yumuşak kabuklu kaplumbağaları (*Pelodiscus sinensis*)

Yaygın düz kuyruklu geko (*Uroplatus fimbriatus*)

Doğu Çit Kertenkelesi (*Sceloporus undulatus*)

2.1.1. Ranavirüs Virion Yapıları ve Sitopatolojileri

Iridoviridae familyasına ait üyeler büyük, çift iplikli DNA virüsleri olarak tanımlanmaktadır. Virionlar genelde 120-200 nm çapında oldukları bilinen ikozohedral simetri göstermeleriyle tanımlanan üyelerdir (Chinchar, 2002). Virionun çekirdeği, tanımlayıcı kapsomerin bir kapsid bileşeni ve transmembran proteinlerini barındıran lipid zar tarafından sarılmış olan nükleoprotein flamenleri içermektedir (Jancovich, 2011). Virion konak hücre zarından tomurcuklanma yoluyla bir zar ile çevrilmektedirler. Zarflı virionlar ise yüksek seviye özgül enfeksiyon potansiyeline sahip olmalarına rağmen gerek zarflı gerek ise zarfsız virionların her ikisi de enfeksiyonel özelliktedir (Braunwald, 1979).



Şekil 2.1: Zarflı ve zarfsız ranavirüs virion yapısı (Holopainen ve Toivonen, 2012).

Amfibi türlerinin yanı sıra ranavirüslerin in-vitro ortamda balıklar, kurbağalar ve memelilerin hücrelerini bulunduran omurgalılarda büyük ölçekli varyasyon içerisinde enfeksiyonöz yetenek gösterebildiği bildirilmiştir (Jancovich, 2011). Virüslerin henüz tanımlanamayan reseptör vasıtası ile hücrelere iki farklı yoldan birisiyle girmeyi başardıkları bilinmektedir; endositoz ile zar parçacıkları veya yalnızca görünümünü

hücreler içine aktarma yolu ile (zarfsız partiküller.) konak canlıyı enfekte etmektedir (Chinchar, 2002). Zarfsız giriş sonrasındaki safhada DNA nükleusa aktarılmakta ve burada immediate early (IE) ve delayed early (DE) viral transkriptler hücrel RNA polIII vasıtasıyla sentezlenmektedir (Goorha vd., 1978; Goorha, 1982). Transkriptlerden biri olan viral DNA polimeraz, çekirdek içinde viral DNA sentezini katalize etmektedir (Goorha, 1982; Chinchar, 2002). Viral DNA replikasyonun ikinci faz ise sitoplazmada gerçekleşmektedir. Yeni sentezlenen DNA buradan taşınarak, on genomdan daha büyük boyuttaki konsatamerik eşit parçalı yapılara rekombine edilmektedir (Goorha, 1982). Geç dönem viral mRNA transkripsiyonu ya sitoplazmada gerçekleşir yahut viral toplanma bölgelerinde olur. Diğer DNA virüsleriyle beraber tüm geç dönem gen ekspresyonu viral DNA sentezine ihtiyaç duymaktadır (Chinchar, 2002). Translasyon sonrasında üretimi ne geniş ölçüde glikozilasyon ne de sülfatilizasyon ya da tespit edilmiş olan Ranavirüs ve primer proteinlerin ayrılması gerektirmektedir (Chinchar vd., 2005). Ranavirüs DNA'sında CpG gen adacıkları üzerinde yüksek seviyede metillenmiş "C" belirlenmiştir (Willis ve Granoff, 1980; Eaton vd., 2007). Viral DNA sitoplazmada virüs tarafından kodlanan sitozin DNA metil transferaz enzimi ile metillenmektedir (Willis vd., 1984).

Viral DNA metil transferaz enzimi FV-3 ve diğer iridovirüsleriye moleküler ölçekte karakterize olmuştur (Kaur, 1995; Mao, 1996). Metilasyonun, viral DNA'yı virüs tarafından kodlanmış olan endonükleazlardan koruduğu fikri öne sürülmüştür (Goorha, 1984). Ranavirüs familyasına ait olan Singapore Grouper İridovirus (SGIV) DNA metil transferaz enzimi içermemektedir (Song, 2004). Bu durum viral DNA metilasyonunun ayrı bir görevinin olduğunu göstermektedir. Metillenmemiş CpG adaları ihtiva eden bakteriyel DNA, doğuştan gelmiş olan bağışıklık düzeyinde reseptör 9 (TLR9) aracısı gibi çalıştığı gözler önüne serilmektedir (Bauer, 2001). Bu durum göstermektedir ki Ranavirüsler kendi genomlarına konak bağışıklık sistemini baskılayabilmek adına metilleyebilirler (Williams, 2005). Virionun hücre içine girişinden sonra viral proteinlerin giriş bölgelerinde transfer olması ve konsametrik viral DNA'nın belirli mekanizmalar sayesinde virionlar içerisinde paketlenildiği bildirilmiştir. Bu sayede ise halkasal permute soylar ve terminal yedek genomlar oluşmaktadır (Chinchar, 2002).

Virionlar hücreden doğrudan plazma zarına zarf parçalarıyla yahut sitoplazma içerisinde geniş bir parakristalin dizisi formunda depolandıktan sonra tomurcuklanma suretiyle ayrılmaktadır (Chinchar, 2002). Konak canlıının içerisinde ranavirüsler hematopoetik doku ve organları enfekte eder. Örnek olarak; böbrek, karaciğer, dalak, gastrointestinal sistem gibi kanamaların yanı sıra bölgesel yahut genel nekrozise neden olur (Reddacliff ve Whittington, 1996; Williams, 2005). Semptomlar ise kanamalar, deride kararmalar, düzensiz yüzmeye, iştahsızlık, ilgisizlik ve düzen bozukluğu şeklinde tanımlanmıştır (Langdon, 1989; Ogawa, 1990; Williams, 2005). Balık enfeksiyonlarında viral parçacıklarının ise iç organları endotelial, epitelyal ve beyaz kan hücrelerinin sitoplazmasında tespit edilebileceği bildirilmiştir (Ahne, 1997).

Iridoviridae ailesi doğrusal çift sarmal içeren DNA genomu ihtiva eden büyük bir virüs (~120-200 nm) olduğu bilinmektedir. Iridoviridae familyası üyelerinin genomik boyutu Chilo yanardöner virüsü için 211 ORF'yi kodlayan kurbağa virüsü 3 ila 212,482 bazlarını kodlayan 97 açık okunur karesini (ORF'ler) kodlayan 105,903 baz arasında yer almaktadır.

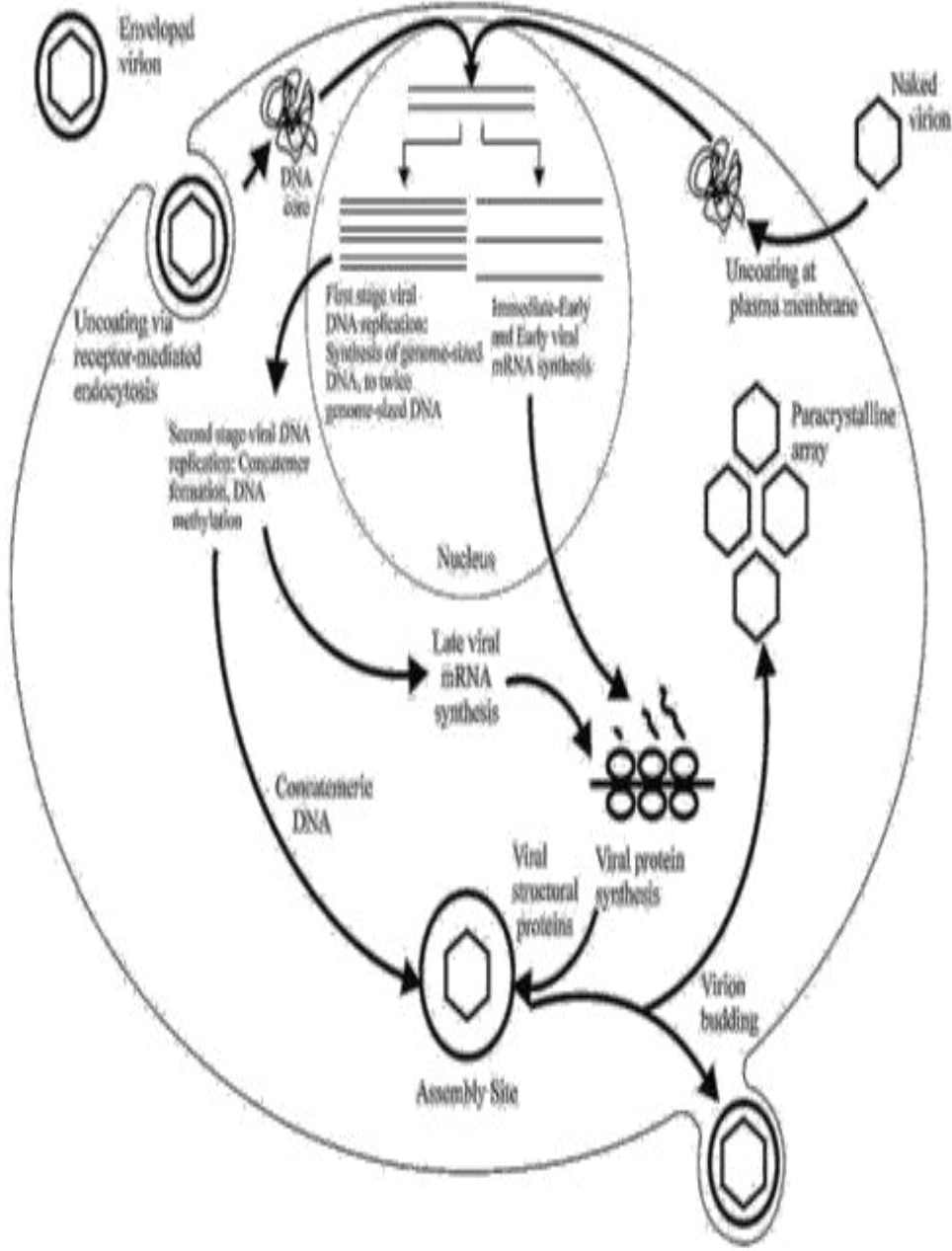
Iridoviridae familyası beş cinse bölünmüştür: Chloriridovirus, Iridovirus, Lenfosistivirüs, Megalositivirüs ve Ranavirüs. İridovirüslerin, omurgasızları ve amfibi, sürüngenleri ve balıkları içeren poikilothermic omurgalıları enfekte ettiği bulunmuştur. Böylesine farklı bir dizi konukçuyla, farklı cinsler arasında gen içeriğinde büyük çeşitlilik vardır.

İridovirüslerin kökenini daha iyi anlayabilmek için, bireysel iridovirüsler arasındaki filogenetik ilişki araştırılmıştır ve ailenin tüm üyeleri tarafından paylaşılan genlerin çekirdek seti tanımlanmıştır. Iridoviridae arasındaki evrimsel ilişkiyi daha fazla araştırmak için aile tekrarlayan dizileriyle tanımlanmakta ve karşılaştırılmaktadır. Her bir genomun gelecekteki virüs tanımlamasında kullanılacak bir dizi benzersiz tekrar eden dizi içeriği bulunmuştur. Birden çok virüste ortak tekrarlar tanımlanmış ve bu tekrarlar arasında kopya sayısındaki değişiklikler, yakın ilişkili virüs nesilleri arasındaki ayrımı yapabilmek adına baside indirgenmiş bir yöntem sağlayabilecektir.

İridovirüsler, enfekte olmuş olan hücreler içinde sitoplazmada çoğalmakta olan büyük çift sarmallı DNA virüsleri olarak tanımlanmaktadır (-120- 200 nm). Bunlar ayrıca bir ikosahedral kapsid ile karakterize edilmektedirler (102 'den 212 kbp). İridovirüsler, çeşitli omurgalılara (Ranavirus, Megalocytivirus, Lenfosistivirüs) ve omurgasızlara (Iridovirüs, Chloriridovirüs) ev sahipliği yapan beş cinse bölünmüştür ve spesifik olarak, iridovirüslerin balıkları, amfibi, sürüngenleri, kabukluları, yumuşakçaları ve böcekleri enfekte ettiği bildirilmiştir. Reseptör aracılığıyla endositoz yolundan iridovirüslerin bağlanma ve girişini takip eden safhada, virüs partikülleri kaplanmamış ve DNA replikasyonunun ilk aşamasının virüs kodlu DNA polimerazı vasıtasıyla gerçekleşeceği çekirdeğe aktarılmaktadır. Viral DNA ise sonrasında, DNA konstemerlerinin oluşumunun gerçekleşeceği DNA replikasyonunun ikinci safhası için çekirdekten sitoplazmaya çıkmaktadır. İridovirüsler ökaryotik virüs genomları arasında benzersiz bir yapıya sahiptir, çünkü hem dairesel olarak geçiren hem de terminal olarak fazlalık olarak tanımlanmaktadır.

İridovirüs enfeksiyonlarının klinik bulguları türler arasındaki büyük farklılıkları göstermektedir ve gözlemlenebilmekte ve semptomlar yok oluşlardan ölüme kadar değişebilmektedir. Bazı iridovirüs familya üyelerine bağlı olarak yüksek morbidite ve mortalite, özellikle suda yaşayan organizmalarda yüksek ekolojik ve ekonomik önemini göstermiştir. Dünyadaki çeşitli türlerden yeni iridovirüs benzeri virüslerin sürekli izolasyonu ile birlikte, iridovirüs patogenezinin daha iyi anlaşılması şarttır. Küresel ölçekte amfibi popülasyonlarının azalışına ve balık ölümlerinden sorumlu olan patojen büyük ölçüde rapor edilmiştir ve kırmızı bacak olarak adlandırılan 'red-leg' hastalığının etken patojenleri olduğu bildirilmiştir. (Chinchar, 2002).

Ranaviruses (family Iridoviridae)



Şekil 2.2: Ranavirüslerin replikasyon döngüsü özeti Chinchar (2002)

Ranavirus cinsinin üyeleri, ekonomik ve ekolojik açıdan önemli soğuk kanlı omurgalıların majör patojenleri olarak kabul edilmiştir. Örneğin, ranavirüsler (RV'ler) Kuzey Amerika'daki, Asya'da, Avustralya'da ve Birleşik Krallık'ta amfibilerden izole edilmiştir. Aslında, ranavirüsler şimdi ortaya çıkan bulaşıcı hastalıkların etkenleri olarak kabul edilir. RV'lere ilgi arttıkça, tamamen sıralanan ranavirüslerin sayısı da artmıştır.

Bu kurbağa virüsü 3 (FV3), genus tür virüs Ranavirus ; kaplan kurbağa virüsü (TFV), Asya'daki kurbağalardan izole edilen FV3 ile yakından ilişkili bir RV; ve Kuzey Amerika'da semender ölümleriyle ilişkili bir RV olan Ambystoma Tigrinum Virüsü (ATV). Ranavirus cinsinin üyeleri olan iki gruplayıcı iridovirüs Gruplayıcı İridovirüs (GIV) ve Singapur Gruplayıcı İridovirüsü (SGIV) yakın zamanda sekanslanmıştır. Ek olarak, el yazmasının hazırlanması sırasında, yumuşak kabuklu kaplumbağa ranavirüsünün (STIV) genomik dizisi mevcuttur.

Ranavirüs genomik sekanslarının karşılaştırılmasıyla elde edilen bilgiler RV evrim tarihine ilişkin içgörü sunar, çekirdek gen gruplarını tanımlar ve viral immün kaçırma ve patogeneze sorumlu genlere içgörü sağlar. Önceki çalışmalar RV izolatlarının spor balıkçılığı için yem olarak kullanılan enfekte semenderlerde büyük mesafelerde yer değiştirebileceğini göstermiştir. Güney Arizona sınırından Kanada'ya uzanan semender RV izolatlarından Kanada'ya kadar olan ana kapsid protein (MCP) dizilerini diğer RV MCP dizilerine karşılaştırmak için filogenetik analiz kullanılmıştır. Veriler, semender RV izolatlarının, FV3 gibi diğer amfibi (kurbağa) RV izolatlarından ziyade, Epizootik Hematopoetik Nekroz Virüsü (EHNV) gibi balık RV izolatları ile daha yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. ATV'nin genomik dizisini FV3 ve TFV'ninkiyle karşılaştıran nokta grafiği analizi iki ana genomik inversiyon göstermiştir, FV3 ve TFV genomları ise tam bir eşzamanlılık göstermiştir. Bu veriler, virüs evrim tarihinin bir noktasında, atalarının virüsü, semender virüsü ve kurbağa virüsü soylarına dağılmış olduğunu gösterir. Sapma anında veya sonrasında soylardan birinde genomik bir yeniden düzenleme meydana gelmiştir.

Konakçıya özgü evrim oluşumunun gerçekleşmesinin gözlemlenmesiyle, izolatlar arasında çapraz geçişi sınırlandırarak kurbağa RV'lerinin, semenderlerin laboratuvar enfeksiyonu sırasında hastalığa sebep olmayacağı ve ayrıca aynı biçimde kurbağaları enfekte eden bu Ranaviruslerin semenderleri de enfekte etmeyeceği anlaşılmıştır. Salamander RV izolatlarının laboratuvar enfekte olmuş kurbağalardan izole edilebileceği veya tespit edilebildiğine ve bir patojen konak kaymasının bu patojenlerin hareketinin bir sonucu olduğuna dair bazı kanıtlar bulunmaktadır. Bu yüzden , çevrede hareket halinde olan RV'lerin ekolojik ve ekonomik sonuçları, yine bu patojenler ile yeni amfibi, balık veya sürüngen popülasyonlarını etkileme ve yok etme potansiyeli

bulunmaktadır. RV'lerin genetik belirleyicilerinin daha eksiksiz şekilde anlaşılması için gelecekteki iletim olaylarının tahmin edilmesine ışık tutacaktır.

Serolojik çalışmalar ve araştırmalar sonuç olarak redfin levrek ve gökkuşağı alabalıklarının da EHNv'nin taşıyıcıları olabileceğini göstermektedir. Virüs, klinik hastalık belirtileri göstermeyen hayvanlardan yeniden izole edilmiştir ve bu, EHNv'nin zayıf konakçı popülasyonlarına translokasyonu ve yerleştirilmesi için ihtimal dahilinde aracılık yapmalarını sağlamıştır. Önveriler ve yayınlanmamış veriler Avustralya kurbağalarının ya da baston kurbağası *Bufo marinus*'un ip aşılandığını göstermiştir EHNv ile serokonversiyona neden olmaktadır fakat klinik hastalık belirtisi olmadığını göstermektedir.

EHNv Kuzey Amerika'da bulunan balık popülasyonlarında tanımlanmamasına karşın, patojenin hayvanların gıda, yem veya bilimsel amaçlarla hareketi yoluyla yer değiştirmesi, böylece naif balık popülasyonlarını enfekte etmesi ve potansiyel olarak yok etmesi olasıdır. EHNv'nin neden olduğu hastalık Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (Office International Epizootics [OIE]) tarafından finfish ölümlerinin başlıca nedeni olarak kabul edilmektedir. Ek olarak hem balıklarda bir EHNv hastalığı hem de amfibiyanlarda bir ranavirüs enfeksiyonu, OIE'ye bildirilebilir hastalıklardır. 1986'da Avustralya'da EHNv'ye bağlı hastalığın tanınmasından bu yana, çiftlik balıklarında benzer sistemik nekrotizan iridovirüs sendromları bildirilmiştir. EHNv bir RV olarak sınıflandırılmış olsa da bu balık patojeni ve amfibi RV'leri arasındaki ilişki daha anlaşılammıştır. Bu yüzden, RV izolatları arasındaki ilişkileri daha iyi anlayabilmek adına, EHNv genomik DNA'sının tam dizisi belirlenmiştir. EHNv genomunun özellikleri, diğer iridovirüslerle ilişkisi ve RV evrimiyle ilgili görüşleri bu çalışmanın odak noktasını oluşturmaktadır.

Çizelge 2.1: İridoviridae. Iridoviridae familyasının özellikleri.

Karakteristik	Açıklama
Tipik üye	Kurbağa virüsü 3 (AY548484), türler <i>Kurbağa virüsü 3</i> , cins <i>Ranavirus</i>
Viriyon	Tipik olarak 150-200 nm (zarflanmamış); kapsid'in ana bileşeni, 48 kDa majör kapsid proteinidir
Genom	92-211 varsayılan proteinleri kodlayan doğrusal, çift sarmallı DNA, 103-220 kbp;genom dairesel olarak geçirilir ve terminal olarak fazlalık kalır
Kopya	İlk aşamada DNA sentezi ve erken transkripsiyon çekirdekte gerçekleşir; daha sonra DNA konatemer oluşumu ve geç transkripsiyon sitoplazmada gerçekleşir; virion morfogenezi sitoplazmik montaj bölgelerinde gerçekleşir
Çeviri	Doğrudan kapaklı, poliadenile edilmemiş mRNA'lardan
Ana bilgisayar aralığı	Alt familya <i>Alphairidovirinae</i> , üyeler amfibi, balık ve sürüngenleri enfekte eder; alt familya <i>Betairidovirinae</i> , üyeler çoğunlukla böcek ve kabukluları enfekte eder.
Taksonomi	İki alt aile arasında bölünmüş beş cins

Virüsler, sırayla bir iç sınırlayıcı membran, bir viral kapsid ile çevrelenmiş merkezi bir DNA / protein çekirdeğinden ve plazma zarından tomurcuklanan parçacıklar halinde, bir dış viral zarftan oluşmaktadır. SDS-PAGE analizi, yaklaşık 30 virion ilişkili proteinin varlığını gösterirken, proteomik analizler daha yüksek rakamlar ortaya koymaktadır (Wong ve diğerleri, 2011, Ince ve diğerleri, 2015). Ana kapsid proteini gibi virion ile ilişkili bazı proteinler, partikülün yapısal elemanlarını içermesine rağmen,

diğerleri katalitik veya düzenleyici rollere, örneğın hemen erken transkripsiyonun virionla ilişkili transaktivatörüne hizmet etmektedir. Viral kapsidler ikosahedral simetri gösterir ve genellikle 120–200 nm çapındadır, ancak 350 nm'ye kadar değişiklik göstermektedir (örn., Lenfosistivirüs cinsi).

Virion çekirdeği elektron yoğunudur ve bir ikosahedral kapsid içine alınmış bir DNA-protein filamentinden oluşmuştur. Her virion, 12 = pentasimetron ve bir icosahedral içinde düzenlenmiş 20 trisimetrondan oluşur; Her iki yapı tipinde, dominant olarak, ana kapsid proteininden (MCP) oluşan viryon başına toplam 1.460 toplam altı değerli kapsomer içerir. Her altı değerli kapsül, dış yüzeyde kovalent olmayan bir MCP trimeri ve iç yüzeydeki disülfür bağları ile bağlanmış ikinci bir MCP trimeri tarafından oluşturulur. Ek olarak, her bir pentasimetron, her virionda toplam 12 olmak üzere, her bir pentasimetronun tepe noktasında, merkezinde, 30 hekszavalent (trimerik) kapsomer ve tek bir pentavalent kapsül içerir. Kapsid kabuğunda ve iç lipid membranı ile birlikte birkaç protein tanımlanmıştır (Yan vd., 2009). Bunlara zip monomerleri ve dimerleri, parmak proteinleri ve çapa proteinleri denilmiştir. Fermuar dimerleri, trimer kapsomerlerini bitişik trisimetronların kenarları boyunca bağlayan bir tokenin iki yarısı görünümündedir ve zip monomerlerinin trisimetron kapsomerlerini komşu pentasimetronlarınkilerle birleştirmede rol aldığı görülmektedir. Üç adet içe dönük dokuz parmak proteini kümesi, kapsülleyicileri her trisimetronun kenarları boyunca bağlar. Son olarak ise bir ankraj proteini, pentavalent vertex'ten iki kapsomer mesafede, her pentasimetronu lipid membran ile birleştirir. Diğer transmembran proteinleri mevcuttur, ancak partikül simetrisine göre değişmeyen konumu nedeniyle görüntü rekonstrüksiyonu çalışmalarında sadece ankraj proteini görselleştirilebilir. Referans olarak MCP kullanılarak yapılan boyut tahminleri, 11,9,19 moleküler kütleleri göstermektedir.

Iridovirus, Chloriridovirus ve Lymphocystivirus cinslerinin üyeleri arasında, kapsidin dış yüzeyi, esnek fibriller veya liflerle kaplanır (Şekil 2B. Iridoviridae). Geleneksel EM çalışmaları, bu fibrillerin genellikle oldukça kısa olduğunu (yaklaşık 2.5 nm uzunluğunda) ve terminal düğmelerine sahip olabileceğini, ancak IIV6'da 2 nm genişliğinde ve yaklaşık 35 nm uzunluğunda tek bir fibrilin her trimerik kapsülün ortasından dışarı uzandığını göstermektedir. Fibrillerin rolü bilinmemektedir. Lifler

ranavirüsler veya megalositirivirüsler arasında bildirilmemiştir. İridoviridler, konak hücre zarı boyunca tomurcuklanarak bir zarf alabilir. Zarf, viryonların spesifik enfektivitesini artırır, ancak yalın partiküller de enfeksiyöz olduğu için enfektivite için gerekliliği bilinmemektedir.

2.1.2. Ranavirüslerin Genomik Özellikleri

Ranavirüs tek-doğrusal ve ikili zincir içeren DNA genomuna sahiptir. Bütün bir genom sekansı 7 ranavirüs izolatu ile tanımlanmıştır. İzolatlar FV-3 (Tan, 2004), EHNV (Janovich, 2010), ATV (Janovich, 2003), Tiger Frog Virüs TFV (He, 2002), Soff-Shelled Turtle Iridovirus STIV (Huang, 2009), Grouper Iridovirus GIV (Tsai, 2005) ve Singapore grouper Iridovirus SGIV (Song, 2004), EHNV, SGIV ve GIV orijinal olarak balıklardan izole edilmiştir. FV3, ATV ve TFV amfibilerden, STIV ise reptil ile orjinlidir. Bu izolatların genomlarının uzunluğu 105-140 kbp arasında farklılık gösterebilmektedir. GC içeriği %48-55 ve potansiyel açık okuma uçlarının sayısı (ORF) 92-139 arasında yer aldığı bilinmektedir. İzolatların ORF'leri 32 ila 1300 aminoasite kadar büyüklüğünün değiştiği bilinmektedir. DNA replikasyonu sırasında, DNA tamirinde, transkripsiyonunda nükleotit metabolizmasında, virion yapısında, virüs konak etkileşimlerinde rol oynayan proteinleri kodlamaktadırlar. Genomların hepsi tekrarlayan sekanslar barındırmaktadır. Bahsedilen sekansların gen regülasyonunda, transkripsiyonunda ve virüslerin protein fonksiyonlarında görev aldığı düşünülmektedir (Kashi ve King, 2006). Ayrıca kodlanamayan RNA'lar örnek olarak mikro RNA'lar (miRNAs) STIV genomu içinde tanımlanmıştır (Huang, 2009).

Memeli virüslerinde miRNA'lar konak immün sistemlerin cevabı, apoptozis viral yaşam döngüsünü ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi sırasında oluşturulan enfeksiyonlarda görev almaktadır (Nair ve Zauolan 2006; Cullen, 2007). Ranavirüs vironunun temel yapısal bileşimi MCP proteindir. MCP'lerin büyüklüğü tipik olarak 50 kDa ile total virion proteinlerinin %40-45 ini oluşturmaktadır (Williams, 1996). MCP geni familia içinde yüksek seviyede korunmuştur ve bu aminoasit sekans kimliğini diğer viral familia ile paylaşırlar. Örneğin; Asfarviridae, Ascoviridae ve Phycodnaviridae (Tidona, 1998; Chinchar 2005). MCP iridovirüslerin en çok

çalışılan genlerinden biridir ve bu gen viral gelişimi saptanmasında en uygun hedef gen olarak kabul edilir (Tidona, 1998). Tüm genom sekanslarının filogenetik analizlerine bağlı olarak EHNV, ATV, FV3, STIV ve TFV birbirleri ile yakın ilişkilidirler ve iridoviruslerden GIV ile SGIV'den ayrı grupları oluşturmaktadır (Eaton, 2007; Huang, 2009; Jancovich, 2010).

Çizelge 2.2: Ranavirüslerdeki kodlanan protein örnekleri ve onların tahmin edilen görevleri (He, 2002; Tsai, 2005; Huang, 2009; Jancovich, 2010).

Fonksiyon	Protein
DNA replikasyonu ve tamiri	DNA polymerase Thymidine kinase NTPase/helicase
DNA transkripsiyonu	RNA polymerase II Transcription elongation factor IIS Ribonuclease III (RNase III)
Nukleotid metabolizması	Ribonucleotide reductase and subunit (RNR and Thymidylate synthase (TS) Deoxyuridine trisphosphate nucleotidohydrolase (dUTPase)
Protein yapısı	Major capsid protein (MCP)
Virüs konak etkileşimi	3-Beta-hydroxy-delta 5-C27 Steroid oxidoreductase-like protein Bcl-2-like protein

2.1.3 Ranavirüslerin Fizikokimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Mol virionlar wt 1,05-2,75 x 10⁹ (S sedimentasyon katsayısına sahip 20 w, 2020- 4460S arasında) ve 1,26-1,60 g cm bir yoğunluk -3. Virüsler, uzun süre 4 ° C'de suda stabildir. Iridovirids pH <3.0 ve> 11.0 ile 10 mertebesinde UV ışınımına maruz bırakılarak etkisiz hale 3 µWs / cm². Virüsler> 55 ° C'de 30 dakika içinde inaktive edilir. Bazı ranavirüsler kuruduktan sonra bulaşıcı kalır, örneğin; Bohle iridovirüs (BIV), 42°C'ye kadar olan sıcaklıklarda 6 hafta süreyle kurumaya devam ederken, diğerleri kurutmaya duyarlıdır.

2.1.4. Ranavirüslerin Nükleik Asit Özellikleri

Virüsler hem benzersiz hem de terminal olarak gereksiz sekanslar içeren bir değer olan 140-303 kbp'lik tek bir doğrusal çift sarmallı DNA molekülünü içerir. Bununla birlikte, sadece benzersiz kısmı göz önüne alındığında, genomlar, spesifik viral türlere bağlı olarak, 103 ila 220 kbp arasında değişmektedir. DNA parçacık ağırlığının%12-16'sını oluşturur ve G + C içeriği yaklaşık% 27 ila% 55 arasındadır. Aile içindeki tüm virüsler, dairesel olarak izin verilen ve terminal olarak gereksiz olan genomlara sahiptir. Omurgalı iridovirüslerin (alt familyası Alphairidovirinae) DNA'sı, gruplayıcı ranavirüsler GIV ve SGIV hariç, yüksek oranda metillenmiş olup, omurgasız iridovirüslerin (alt familya Betairidovirinae genomları içinde hiçbir metilasyonu bulunamamıştır). Tüm genomik dizilim, her cins için mevcut olan temsili dizilim bilgisine sahip ailenin 40'tan fazla üyesi tarafından bilinmektedir.

Çizelge 2.3: İridoviridae Iridovirus genom içeriği.

Alt aile Alphairidovirinae

Cins	Türler	izolatı	Genom (bp)	ORF'ler	GC %	Erişim numarası
<i>Lymphocystivirus</i>	<i>Lenfosist hastalığı virüsü 1</i>	lenfosit hastalığı (LCDV1)	102653	108	29	L63545
<i>Ranavirus</i>	<i>Kurbağa virüsü 3</i>	kurbağa virüsü (FV3)	3 105903	97	55	AY548484
	<i>Bohle iridovirus</i>	Bohle iridovirus (BIV)	103531	100	55	KX185156
	<i>Ambystoma tigrinum virüsü</i>	Ambystoma tigrinum virüsü (ATV)	106332	92	54	AY150217
	<i>Avrupa yayın balığı virüsü</i>	Avrupa yayın balığı virüsü (ECV)	125549	136	54	KT989885
	<i>Epizootik hemapoietik nekroz virüsü</i>	epizootik hemapoietik nekroz virüsü (EHNV)	127011	100	54	FJ433873
	<i>Yaygın ebe kurbağa virüsü</i>	ortak ebe kurbağa virüsü	106878	104	55	JQ231222
	<i>Santee-Cooper</i>	çipura levrek bas	ND ^a	ND	ND	DQ15994

(CMTV)

	<i>ranavirus</i>	virüsü (LMBV)				0
	<i>Singapur orfoz iridovirüs</i>	Singapur gruplayıcı iridovirüs (SGIV)	140131	139	49	AY521625
<i>Megalocytivirus</i>	<i>Enfeksiyöz dalak ve böbrek nekroz virüsü</i>	bulaşıcı dalak ve böbrek nekroz virüsü (ISKNV)	111362	117	55	AF371960
Alt aile Betairidovirinae						
Cins	Türler	izolatı	Genom bp	ORF'ler	GC %	Erişim numarası
<i>Iridovirus</i>	<i>Omurgasızlar yanardöner virüsü 6</i>	omurgasızlar yanardöner virüsü 6 (IIV6)	212482	211	29	AF303741
	<i>Omurgasız yanardöner virüsü 1</i>	omurgasızlar yanardöner virüsü 1	ND ^b	ND	ND	M33542
<i>Chloriridovirus</i>	<i>Omurgasızlar yanardöner virüsü 3</i>	omurgasızlar yanardöner virüsü 3 (IIV3)	191132	126	48	DQ643392

Largemouth bass virüsü, doktor balık virüsü ve lepistes virüsü 6 genom sekansları yayınlanmamıştır, ancak 26 çekirdek protein geninin nükleotit sekansları belirlenmiş ve ailenin diğer üyelerinin sekansları ile hizalanmıştır; Üç izolatu tamamı *Santee-Cooper ranavirus* türüne yerleştirilir. Erişim sayıları, bu izolatların ana kapsid protein genleri içindir. IIV1 genomunun dizisi belirlenmedi. Erişim numarası ana kapsid proteinidir.

2.1.5. Ranavirüslerin Protein Özellikleri

Nükleotit sekans analizi, ailenin çeşitli üyeleri arasında 100'den fazla ORF tanımlamıştır; 26'sı tüm iridoviridlerde ortaktır (Eaton vd., 2007). Aşağıda tartışıldığı gibi, viral proteinler, birbiriyle örtüşen üç kategoriden birine sınıflandırılabilir: katalitik, yapısal ve virülansla ilgilidir. Katalitik proteinler, korunan 26 proteinin çoğunu içerir ve virüs kodlu DNA polimerazını, RNA polimeraz II (vPOL-II) viral homologunun en büyük iki alt birimini ve ribonükleotit redüktazın küçük alt birimini içerir. Çoğu durumda, atanmış işlevleri varsayılandır ve veritabanındaki diğer proteinlerle homolojiye dayanır. Ancak, bazı durumlarda fonksiyon örneğin geç viral gen ifadesinde belirgin bir azalma bir antisens morfolino oligonükleotid sonuçlarını kullanarak vPOL-Ha ait yıkmak, deneysel doğruladı ve viral transkriptaz gibi rolünü desteklemektedir edilmiştir. İridovirid partikülleri, hem yapısal hem de virion ile ilişkili proteinlerin kompleks düzenekleridir. MCP ve yukarıda bahsedilen fermuar, parmak ve çapa proteinleri gibi yapısal elemanların yanı sıra, viryonlar, kütle halinde 5 ila 250 kDa arasında değişen ilave 30 (veya daha fazla) protein içerir.

Ana kapsid proteini (MCP, 48-55 kDa), tüm iridoviridler arasında yüksek oranda korunur ve toplam viryon protein kütlelerinin % 40'ını içerir. MCP'nin amino asit (aa) dizisi, virüs tanımlamasında ve filogenetik analizlerde kullanılmıştır. Son olarak, kısıtlayıcı ortamlarda (örn. Sakin hücreler) viral replikasyonu geliştiren veya konakçı immün yanıtlarını bloke eden birkaç olası virülans veya immün kaçınma proteini saptanmıştır (Grayfer vd., 2015).

Bunlardan ilki, viral enfeksiyon sırasında deoksiribonükleotit havuzlarını koruyan dUTPaz, timidin kinaz ve ribonükleotit redüktazın viral homologları iken, ikincisi, vCARD, vIF-2a, vRNase III ve steroid- steroid dehidrojenaz arasında doğuştan gelen ve edinilen immüniteyi bloke etme işlevi görebilir (Grayfer vd., 2015). Örneğin, ökaryotik translasyon başlatma faktörü eIF-2a'nın viral homologu vIF-2a, protein kinaz R aracılı translasyon kapanmasını bloke eder ve enfeksiyon sırasında viral protein sentezini korur (Rothenburg vd., 2011).

Çizelge 2.4: Iridoviridae. Aile üyelerinin çekirdek genler Iridoviridae.

ORF ^b	Varsayılan işlev	Kategori ^c	ORF ^b	Varsayılan işlev	Kategori ^c
1R	Varsayılan çoğaltma faktörü ve / veya DNA bağlayıcı / paketleme proteini	C	57R	Serin / treonin protein kinazı	C
2L	Mirillenmiş membran proteini	S	60R	DNA polimeraz ailesi ekzonükleaz	B C
8R	DNA'ya bağımlı, RNA polimeraz II, α alt birimi	C	62L'lik	DNA bağımlı, RNA polimeraz II, β alt birim	C
9L	NTPaz / sarmal	C	67L	Ribonükleotid redüktaz, küçük alt ünite (RR α)	
12L	Bilinmeyen işlev	UNK	80L	RNase III	
15R	DNA ambalajı için gerekli olan poxvirus A32'ye benzer AAA-ATPase	C	81R	Transkripsiyon uzama faktörü TFIIS	C
19R	Serin / treonin protein kinazı	C	84R	Proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA)	C

21L	Helicase familyası proteini	C	85R	Deoksitükleosid kinaz	C
22R	DNA replikasyonuna katılan familyası NTPaz	D5 C	88R	Erv / Alr tiyol oksidoredüktaz ailesi	
27R	Varsayılan tirosin kinaz / LPS değiştirici enzim	ÖZGEÇMİŞ	90R	Major kapsid proteini (MCP)	S
37R	NIF-NLI etkileşim faktörü	V	91R	Acil erken protein ICP-46	UNK
41R	Vaccinia virüsü erken transkripsiyon faktörü	C	94L	Uvr / helikaz	REP C
53R	Mirillenmiş membran proteini	S	95R	Varsayılan RAD2 nükleaz	tipi C

Belirtilen 26 iridovirid çekirdek genine ek olarak, 27 ranavirüs spesifik gen ve 13 amfibi benzeri ranavirüs geni tanımlandı (Eaton vd., 2007; Jancovich vd., 2010). Ranavirüs spesifik 27 geninden 24 bilinmeyen bir fonksiyona sahipken, bilinen üçü CARD içeren bir proteini (64R), dUTPaz'ı (63R) ve nörofilament üçlüsü H1 benzeri proteini (32R) kodlar. Benzer şekilde 13 amfibi ranavirüs benzeri genin sadece ikisi (26R, vIF-2a; 82R, hemen erken 18 kDa proteini) varsayılan homologlara sahiptir. ORF tanımlamaları, kurbağa virüsü 3 genomundaki pozisyonlarına dayanır (AY548484). Harfleri belirtilen proteinlerin bilinen veya varsayılan işlevini yansıtır: C, katalitik;S, yapısal, V, virülans;

UNK, bilinmiyor. Ek olarak, viryonlarla ilişkili proteinler olarak viryonların içinde muhtemelen birkaç katalitik protein bulunur.

2.1.6 Ranavirüslerin Lipid Özellikleri

Zarflanmamış parçacıklar, ağırlıklı olarak fosfolipid olarak % 5-17 lipid içerir. Virüsler, DNA çekirdeği ve viral kapsid arasında uzanan bir iç lipid zarına sahiptir ve tomurcuklanan viryonlarda, plazma zarından bir dış viral zarf alınır. Dahili lipid membranının kökeni belirsizdir, ancak vaccinia virüsü, Afrika domuz nezlesi virüsü ve Paramecium bursaria chlorella virüsü gibi diğer nükleer sitoplazmik büyük DNA virüslerinden (NCLDV) elde edilen kanıtlara dayanarak, muhtemelen konukçu endoplazmik parçalanmasından kaynaklanmaktadır. Retikulum (Romero-Brey ve Bartenschlager, 2016; Milrot vd., 2016). Diğer NCLDV'lere benzer şekilde, iç zar muhtemelen virid düzeneğinde kapsid proteini birikmesinin gerçekleştiği bir iskele görevi görerek kilit bir rol oynar.

2.1.7. Ranavirüslerin Karbonhidrat Özellikleri

Karbonhidrat içeren proteinler (glikoproteinler) lenfosistis hastalığı virüsü içerisinde tespit edilmiş ve muhtemelen ailenin diğer üyeleri içinde bulunmaktadır (Garcia- Rosado vd., 2004).

2.1.8. Ranavirüslerin Genom Organizasyonu ve Replikasyonu

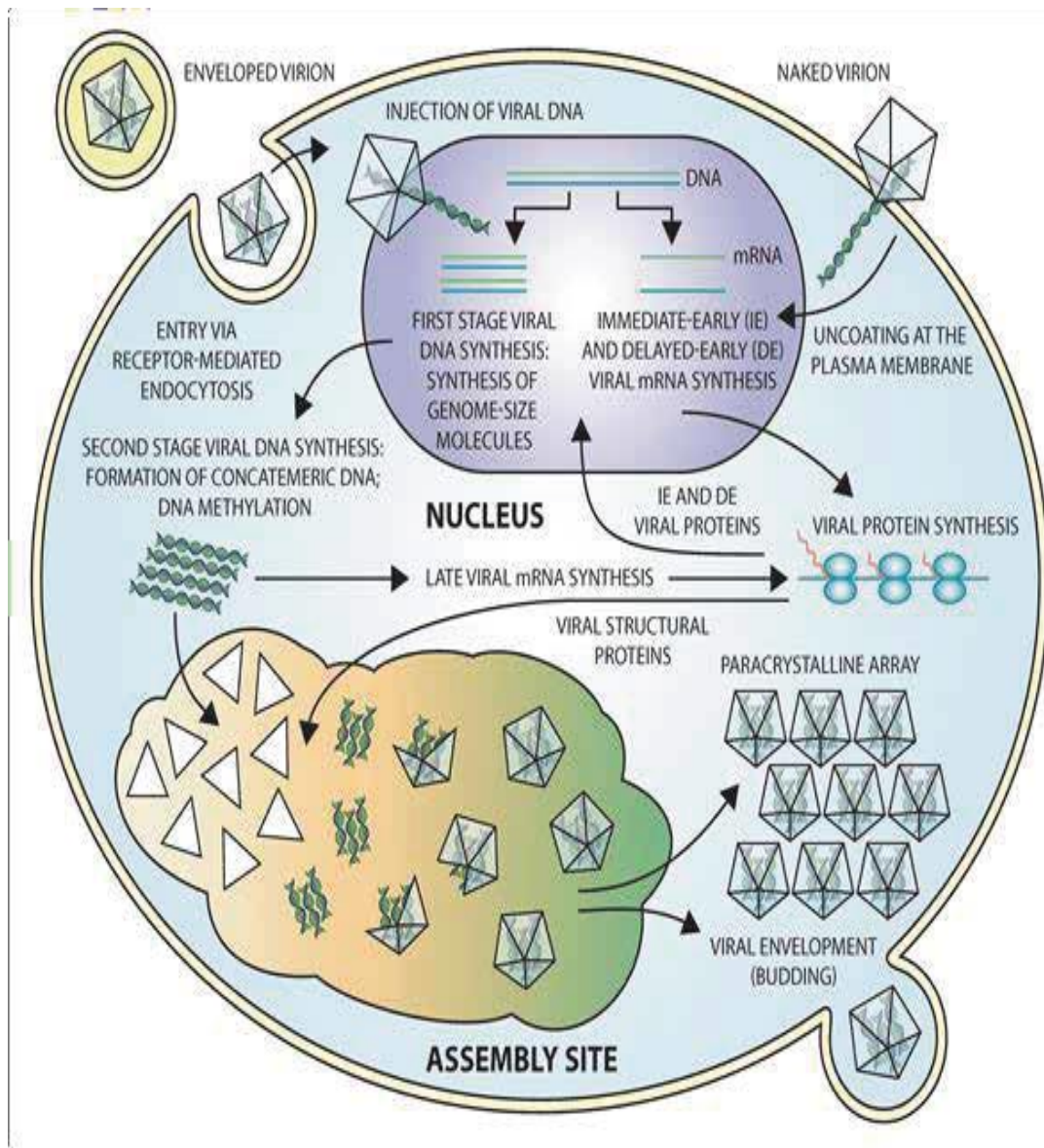
İridovirid genomları, benzersiz bir bileşen ve değişken miktarda terminal fazlalığı içerir. Eşsiz bileşen 103 ila 220 kbp arasında değişirken, gerçekte genom içeriği, terminal fazlalık varlığından dolayı farklı türlerin üyeleri için % 5-50 daha büyüktür. LCDV1 (103 kbp) hariç olmak üzere, üyelerine genomları Lymphocystivirus, Iridovirus ve Chloriridovirus genera üyeleri için daha (163-220 kbp) daha büyük olan Megalocytivirus ve Ranavirus cins (103-140 kbp). SGIV hariç, içindeki türlerin üyeleri ile Ranaviruscins, belirgin bir doğrusal doğrusallık gösterme eğilimindedir. Bununla birlikte, bu cins içinde bile, genom inversiyonları ve silmeleri kaydedilmiştir. Varsayılan açık okuma çerçeveleri (ORF'ler), viral genomun her iki şeridinde bulunur, ancak kodlama bölgelerinin üst üste binmesi nadirdir Dahası, gen yoğunluğu yüksektir, intergenik bölgeler genellikle kısadır ve genomlar tekrarlayan diziler içerir.

Ökaryotların aksine, iridovirid genleri intron içermez ve viral mRNA'lar poli [A] kuyruklarından yoksundur. Bununla birlikte, ökaryotlar gibi, biyokimyasal ve siliko kanıtları, viral gen ekspresyonunu modüle eden viral mikroRNA'ların (miRNA) varlığını göstermektedir. İridoviridler, Ranavirus cinsinin türünün türü olan FV3'ün çalışmasıyla ortaya konulan hem nükleer hem de sitoplazmik aşamaları içeren yeni bir replikasyon stratejisi kullanır (Chinchar vd., 2009; Jancovich vd., 2015; Williams vd., 2005). Her ne kadar viryon girişinin kesin mekanizması açıklanmaya devam etse de, zarflı partiküller tarafından reseptör aracılı endositoz, çıplak zarlarla plazma zarında kaplanma, pinositoz ve kaveola bağımlı endositoz gibi kapama dahil çoklu yollar uygulanmıştır (Wang vd., 2014). Kaplamanın ardından viral DNA çekirdeği, ilk aşama DNA sentezinin ve hemen erken (IE) ve gecikmiş erken (DE) viral transkriptlerin sentezinin yapıldığı çekirdeğe girer.

İyi anlaşılmayan bir işlemde, bir veya daha fazla virionla ilişkili protein, transkripsiyonel bir işlem gerçekleştirici olarak işlev görür ve şablon olarak metillenmiş viral genomu kullanarak IE viral mRNA'larını sentezlemek için konak RNA polimeraz II'yi yeniden yönlendirmektedir. IE (ve belki de DE) viral transkriptleri tarafından kodlanan gen ürünleri hem düzenleyici hem de katalitik proteinleri içermektedir.

Bu gen ürünlerinden biri olan viral DNA polimerazı, ana viral genomun şablon olarak görev yaptığı viral DNA sentezinin ilk aşamasını katalize eder ve genom uzunluğunun en fazla iki kez genom uzunluğundaki progen DNA'sı sentezlenir. Yeni sentezlenmiş viral DNA, ilave DNA replikasyonu veya erken transkripsiyon turları için şablon olarak kullanılabilir veya viral DNA, viral DNA sentezinin ikinci aşamasının gerçekleştiği sitoplazmaya taşınabilmektedir. Orada, viral DNA sentezi, büyük, dallı konatemerler oluşumuyla sonuçlanır. Viral DNA metilasyonu sitoplazmada da ortaya çıkar ve kesin rolü kesin olmasa da, viral DNA'nın virüs aracılı endonükleolitik saldırıdan korunması gerektiği düşünülmektedir. Dolayısıyla, izin verilmeyen sıcaklıkta viral DNA'yı sentezleyemeyen sıcaklığa duyarlı mutantlar ve DNA sentezi inhibitörlerin varlığında kuluçkalanmış enfekte hücreler, geç dönem viral transkripsiyon ve proteinlerin belirgin şekilde azalmış seviyelerini göstermektedir. Virion oluşumu sitoplazmada, virüs toplanma bölgeleri olarak adlandırılan morfolojik yönden farklı bölgeler içinde gerçekleşmektedir. Yapışma bölgeleri, vPOL-IIa'yı hedef alan bir antisens morfolino

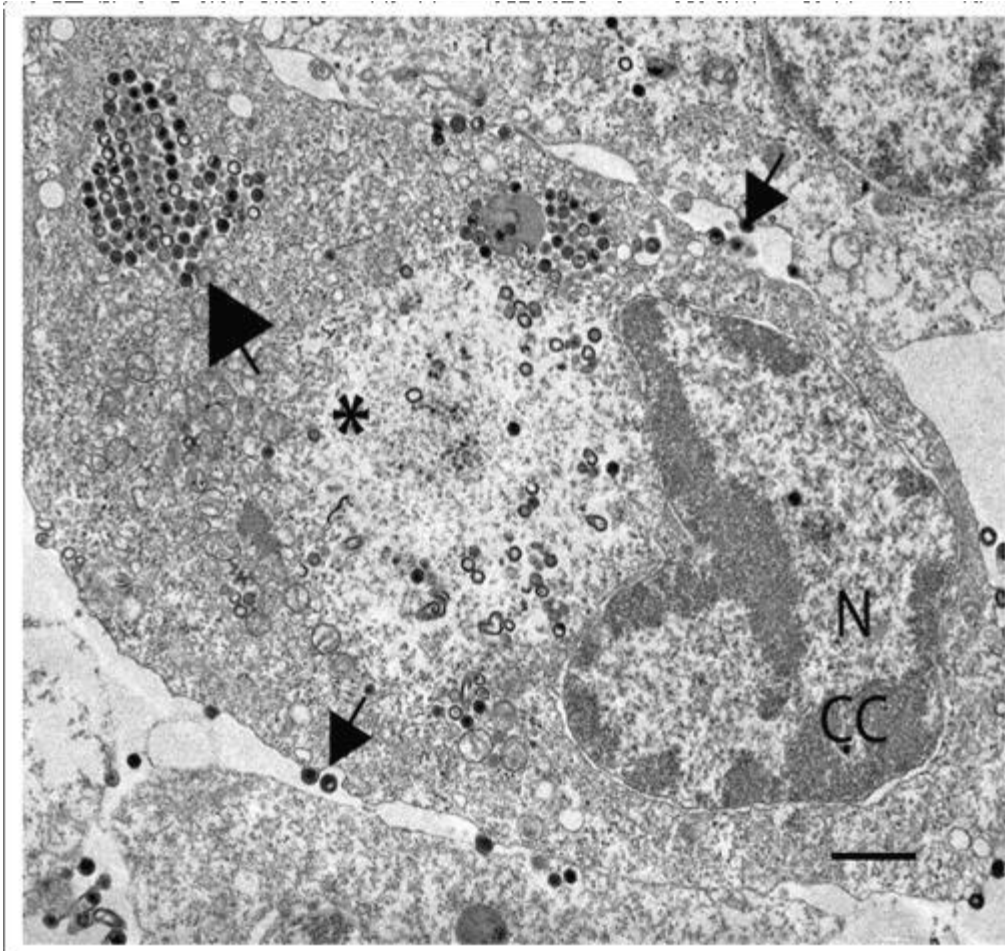
oligonükleotidi (asMO) ile tedavi edilen hücrelerden oluşmuştur, yapışma bölgesi oluşumunun geç dönem viral gen ürünlerinin sentezini gerçekleştirmediğini göstermektedir (Sample vd., 2007). Konkatermik viral DNA'nın, virgüllere, dairesel geçişli ve terminal genomların oluşmasıyla sonuçlanan "baş" mekanizması ile paketleniği düşünülmektedir. Toplanmanın ardından, virionlar, parakristal diziler içindeki sitoplazmada birikir veya plazma zarından tomurcuklanarak bir zarf alır (Liu vd., 2016). Çoğu omurgalı enfeksiyöz iridovirüs etkisi altındayken viryonların çoğu hücreler ile ilişkili halde bulunmaktadır.



Şekil 2.3: İridoviridae. Kurbağa virüsü 3'ün (FV3) çoğaltma stratejisi.

Çoğalma, çekirdekte erken viral transkriptlerin sentezi ve birim büyüklüğünün sentezi ile başlar, iki kez birim büyüklüğüne, daha sonra ikinci bir DNA replikasyonu turunun büyük konsatemerler oluşmasına neden olduğu sitoplazmaya taşınan DNA genleri ile başlar.

Geç mesajlar, çok alt üniteli, virüs kodlu bir transkriptaz kullanılarak sitoplazmada sentezlenir. Virion oluşumu morfolojik olarak farklı montaj bölgelerinde gerçekleşir ve montaj bölgelerinde viral parçacıklar, parakristal diziler ve plazma zarından tomurcuklanma görülür.



Şekil 2.4: Iridoviridae. FV3 ile enfekte olmuş bir yağ kafasının transmisyon elektron mikrofrafisi.

Nucleus, N, kromatin yoğunlaşma belirtileri (CC); sayısız olgunlaşmamış, boş viryonlar, az sayıda olgun viryon içeren ve hücrel organellerden yoksun olan büyük bir elektron berraklı montaj bölgesi (*); parakristal bir virüs parçacıkları dizisi (büyük

ok); tomurcuklanan viryonlar (küçük ok); ölçek çubuğu = 1 µm (VG Chinchar ve RC Sample tarafından sağlanır.

2.1.9 Ranavirüslerin Antijenlik Özellikleri

Aile içindeki farklı cinslerin üyeleri serolojik olarak birbirlerinden farklıdır, oysa belirli bir cins içindeki farklı türlerin üyeleri arasında çapraz reaktivite MCP'nin ve diğer viral proteinlerin sekans korunmasından dolayı oluşabilir (Ariel vd., 2010). Üç ranavirüsü (EHNV, ECV ve Avrupa sheatfish virüsü (ESV)), birbirleriyle ve FV3 ile serolojik çapraz reaktivite gösterir (Hedrick vd., 1992). FV3 ile enfekte edilmiş *Xenopus laevis*'in çalışmaları, sekonder enfeksiyon ve koruyucu nötrleştirici antikorların üretilmesinden sonra belirgin bir antikor tepkisi göstermektedir (Grayfer vd., 2015). Ayrıca, koruyucu bir antikor tepkisi ile tutarlı olarak, etkisizleştirilmiş virüs aşılı, RSIV'in aracılık ettiği hastalıklara karşı korur. Ek olarak, FV3 *Xenopus laevis* modelinde, T hücreleri viral hastalığa karşı korunma ile ilgili olmuştur (Grayfer vd., 2015; Morales ve Robert 2007). Bununla birlikte, bir T hücre yanıtını tetikleyen kesin FV3 proteinleri bilinmemektedir.

2.1.10. Ranavirüslerin Epidemiyolojisi

Toplamda, altı kıtada 32 ülkeden en az 175 ektotermik omurgalı türünde (52 aile) enfeksiyona veya açık hastalığa neden olan altı Ranavirüs tanımlanmaktadır. İridoviridler, yalnızca deniz ve tatlı su habitatları dahil olmak üzere nemli ya da sucul ortamlarla ilgili olan ektotermik omurgalılarından ve omurgasızlardan izole edilmiştir. İridovirid türleri, üyelerinin doğal konak aralıkları ve virülansları bakımından geniş ölçüde değişir. Omurgasız iridovirüsler, örneğin yamyamlık, ayrıca endoparazitik eşekarısı veya parazitik nematodlar gibi peroral olarak bulaşabilir. Omurgasız iridovirüslü enfeksiyonlar iki kategoriye ayrılır: patent ve gizli. Birincisinde, virüs replikasyonu genişir ve enfekte olmuş hayvanlar, enfekte olmuş dokularda çok sayıda virion bulunması nedeniyle mavi veya yeşil yanardönerlik gösterir. Daha yaygın olan ikinci durumda, daha düşük virüs seviyeleri mevcuttur ve yanma yoktur. Bununla birlikte, düşük viral yüke rağmen, gizli olarak enfekte olan hayvanlar genellikle düşük zindelik göstermektedir (Williams vd., 2005). Megalocytivirus ve Lymphocystivirus

cinslerinin üyeleri sadece balıkları enfekte ederken Ranavirus cinsinin üyeleri balık, amfibi ve sürüngenleri enfekte eder. Virüsler deneysel olarak enjeksiyon veya banyoya daldırma yoluyla ve doğal olarak yamyamlık veya enfekte olmuş karkasların atılması dahil olmak üzere birlikte yaşama ve beslenme yoluyla bulaşabilir. Hem megalositivirüsler hem de ranavirüsler iç organlarda çoğalır ve FV3 durumunda böbrek ana hedeflerden biridir. Buna karşılık, lenfistivirüslerle enfekte olmuş balıklar, büyük ölçüde büyütülmüş bireysel virüs bulaşmış hücrelerin sonucu olan dış yüzeylerde (ve bazen iç organlarda) siğile benzer büyümeler gösterir. Yaklaşık %100'lük ölüm oranlarına neden olabilen megalositivirüs veya ranavirüs enfeksiyonlarının aksine, lenfosistivirüslü enfeksiyonlar kendiliğinden düzelir ve ölüm oranları genellikle düşüktür.

Balıklarda Ranavirüs epidemiyolojisi;

Ranavirüslerin pek çoğu kültür balıklarında görülen ölüm olaylarıyla ilişkilendirilmiştir (örneğin, Ahne vd., 1997; Chua vd., 1994; Deng vd., 2011; Langdon vd., 1988; Prasankok vd., 2005; Qin vd., 2003), fakat bu su kültüründe bulunan sistemlerinin epidemiyolojisi ve ekolojisi ender olarak iyi belgelenebilmiştir.

Balıklarda ranavirüs ekolojisi ve epidemiyolojisi kapsamında bilinenlerin pek çoğu, Avustralya'da bulunan Epizootik hematopoietik nekroz virüsü (EHNV) ve Güneydoğu ABD'de görülen büyük ağızlı bas virüsü (LMBV; Santee Cooper ranavirüsün bir türü) çalışmaları kaynaklıdır (Whittington vd., 2010). EHNV salgını, yaz başlarında onlarca hatta binlerce genç redfin levrekini (*Perca fluviatilis*) etkilemiş ve hızlı bir şekilde (2-3 hafta) ölümlere sebebiyet vermiştir (Langdon vd., 1986; Langdon ve Humphrey, 1987). Daha önce EHNV geçmişine sahip olmayan izole havuzlarda, yetişkin bireylerde (> 1 yaşında) kitlesel ölümler olmuştur ve bu önceki maruz kalmayı veya ontogeninin rolünü düşündürmeye sevk etmektedir. Ölümler dramatik olsa ve son 30 yıldır devam ediyor olsa da, derin sularda ve uzak yerlerde belirsiz tespitler göz önünde bulundurulduğunda, EHNV salgınların meydana gelme sıklığıyla değerlendirmek zor bir iştir (Whittington vd., 2010). LMBV ölümleri çoğunlukla yaz aylarında meydana gelmektedir. LMBV bazı zamanlarda binlerce büyük balığın ölümüyle ilişkilendirilmiştir (Plumb vd., 1996; Hanson vd., 2001) ve 1990'larda bazı çalışma

gerçekleştirilen göllerde (Maceina ve Grizzle, 2003) kaydedilen daha büyük ve daha yaşlı büyük ağızlı levreğin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Hastalıklı ve/veya ölmekte olan balıkların görülme sıklığı genellikle fark edilemeyecek kadar düşüktür (Grizzle ve Brunner, 2003). Ayrıca, LMBV genellikle klinik olarak normal görünüşlü hayvanlarda ve ölme öyküsü (gözlemlenen) mevcuttur. (Hanson vd., 2001; Grizzle vd., 2002; Grizzle ve Brunner, 2003). Bu iki balık ranavirüsünün epidemiyolojisi ortak bir tema içermektedir ve epidemilerin esasen stresli altında buldukları yaşam koşulları (örneğin sıcak dönemler) sırasında belirli duyarlı yaşam öyküsü basamaklarını (gençlerde EHNV ve yetişkinlerde LMBV) barındırmaktadır. Ranavirus cins içerisinde ayrı bir filogenetik soy temsil ederler (Qin ve ark.2003; Huang vd.2011), Grouper iridovirus (GIV) ve Singapore grouper iridovirus (SGIV) 'den bahsetmek gerekir. Bu bahise konu olan virüsler, Güneydoğu Asya'da 1990'ların ortalarından beri deniz ürünleri yetiştiriciliğinde orfozlarda (Epinephelus spp.) ve diğer fin balıklarında önemli ölüm ve kayıplara neden olmuştur (Chua vd., 1994; Qin vd., 2003; Harikrishnan vd., 2010). Bu virüsün epidemiyolojisi hakkında çok az ayrıntı bildirilmiştir, ancak birkaç hafta içinde salgınlar ortaya çıkmaktadır (Nagasawa ve Cruz-Lacierda, 2004), %90'a varan ölüm oranlarına neden olur ve stres (örneğin, stresle başa çıkma, su kalitesi) klinik belirtilerin ve ölüm oranının büyütülmesinde rol oynayabilir (Chua vd., 1994).

Amfibilerde Ranavirüs epidemiyolojisi;

Amfibilerde Ranavirüs enfeksiyonları sebebiyle ölüm olayları, Kuzey-Güney Amerika, Avrupa, Afrika ve Asya'daki türler üzerinde bildirilmiştir. Kuzey Amerika'da amfibi ölüm olaylarının% 43-57'si viral enfeksiyonlara, yüksek ihtimalle de ranavirüslere bağlanmıştır. Bu salgınların genel olarak yaz ortasından yaz sonuna kadar ortaya çıktığı ve geç evre kurbağa yavrularını ve yeni başkalaşımalarını tamamlamış kurbağaları etkilediği bilinmektedir. Ölümler genellikle anidir, bir günde yüzlerce veya binlerce görünüş olarak normal sayılabilecek larvalar birkaç gün içinde >% 90 oranında bir ihtimalle ölür. Yakın tarihte yayınlanmış bir raporda, en az 200.000 larva sadece 24 saat içinde ölmüştür (Wheelwright vd., 2014). Avrupa'da bulunan vahşi amfibi türlerindeki hızlı, mevsime bağlı salgınlara ilişkin de benzer raporlar mevcuttur (Ariel vd., 2009; Kik vd., 2011), Güney ve Orta Amerika (Fox

vd., 2006; Stark, 2014) ve Asya (Une vd., 2009) ve benzer kalıpları izleyen endemik popülasyonlardan yaygın raporlar (Duffus vd., 2015).

Price vd. (2014), geçtiğimiz günlerde, yeni bir ranavirüsün bariz şekilde ortaya çıkışıyla İspanya'da birden fazla bölgeyi kapsayan araştırmalara konu olan amfibi topluluklarındaki düşüşler bildirilmiştir. Bunun yanı sıra, ranavirüsün, ciddi hastalık ve/veya mortalite olmaksızın larva ve metamorfik amfibilerde mevcut olduğuna dair birkaç rapor vardır (Duffus vd., 2015), ancak çoğu çalışmada boylamsal veri toplanamaz ve ölüm olayları gözden kaçırılma eğilimi göstermektedir (Gray vd., 2015). Ranavirüs sebebiyle mortal olmayan enfeksiyonların sporla yayılma, büyüme ve gelişme ile ilgili özellikleri etkileyebileceğini belirtmek gerekir (Echaubard vd., 2010).

Sürüngenlerde Ranavirüs epidemiyolojisi;

Sürüngenlerde, ranavirüs enfeksiyonları, özellikle rehabilitasyon tesislerinde ve diğer üreme ortamlarında ara sıra tespit edilmiştir (Ariel, 2011; Allender vd., 2013; Chinchar ve Waltzek, 2014). Serbest dolaşan chelonyanlarda birkaç salgın gözlemlenirken (Allender vd., 2006; Johnson vd., 2008; Belzer ve Seibert, 2011; Farnsworth ve Seigel, 2013), diğer sürüngen taksonlarının serbest halde yaşayan popülasyonlarında benzer ranavirüs raporu yoktur. Balıkların ve amfibilerin aksine, Kuzey Amerika'da kelonlarda görülmekte olan ranavirüs salgınları daha yaygındır. Ölümler, aktif yaşam sezonlarının tamamında (yani kaplumbağalar kışın kış uykusunda olmadıklarında), genellikle birkaç yıla yayılmıştır (Belzer ve Seibert, 2011; Farnsworth ve Seigel, 2013). Ancak çoğu vaka yaz aylarında görülmektedir. Mevcut kanıtlar, ranavirüslerin kelonlarda akut, hızlı mortal bir enfeksiyona sebep olduğunu ortaya koymaktadır (Johnson vd., 2007). Enfekte olmuş bireylerin çoğu birkaç hafta içinde ölmektedir, bu sebeple herhangi bir zamanda enfeksiyon prevalansı düşüktür. Örneğin, serbest dolaşan 71 doğu kutu kaplumbağasından (*Terrapene carolina carolina*) 15'i (% 21) Pennsylvania, ABD'deki özel bir doğa koruma alanında bir ranavirüs ölümü sırasında öldü (Johnson vd., 2008; Belzer ve Seibert, 2011). Ertesi yıl hayatta kalan 55 kaplumbağadan sadece biri seropozitif, bu da enfekte bireylerin büyük çoğunluğunun öldüğünü kuvvetle düşündürüyor (Johnson vd., 2010).

Benzer şekilde, Allender vd. (2013), ABD'nin Tennessee eyaletindeki serbest dolaşan doğu kaplumbağalarında ranavirüs enfeksiyonu prevalansının 3 yıl içinde çok düşük olduğunu (1/309;% 0.3) gözlemlemişlerdir. ABD'nin güneydoğusundaki beş eyalette serbest dolaşan gopher kaplumbağalarının (*Gopherus polyphemus*) seroprevalansı da düşüktü (% 1.5; Johnson vd., 2010), bu oldukça virülan, akut enfeksiyon ile uyumludur. Daha fazla su kaplumbağasında ranavirüs enfeksiyonlarının daha az patojenik olabileceğine dair bazı kanıtlar bulunmaktadır. Bu hipotez ile tutarlı olarak, ranavirüs prevalansı, Virginia, ABD'de yüksek oranda suda yaşayan doğu boyalı kaplumbağalarda (*Chrysemys picta picta*) daha yüksekti (11/63;% 17) (Goodman vd., 2013).

Mevcut bilgiler ışığında, chelonianlardaki sporadik mortalite olaylarının kendi kendine devam eden ranavirüs salgınlardan doğma olasılığı düşük görünmektedir. Kelonyanlardaki Ranavirüs enfeksiyonları akut ve genellikle öldürücüdür, bu da enfekte olmuş kaplumbağaların zayıf kaplumbağalarla temas etmesi için çok az zaman sağlar. Dahası, çoğu karpuz popülasyonu düşük yoğunluklarda bulunur ve bu da bulaşma fırsatlarını daha da sınırlar. Bu nedenle bu ölümler muhtemelen diğer türlerden ranavirüs enfeksiyonlarının yayılmasından kaynaklanmaktadır.

Ranavirüs epidemiyolojisinin özeti;

Doğal popülasyonlar çerçevesinde bakıldığında ranavirüs epidemiyolojisini kapsayan hala büyük bir belirsizlik olsa da, iki model açıktır.

Birincisi, en azından balıklarda ve amfibilerde, ranavirüs salgınları veya ölüm olayları için ortak bir zamansal modelin var olduğunu göstermektedir. Ölümler, genellikle yaz aylarında hızlı bir başlangıç gösterir ve bu modelin önemli istisnaları olmasına rağmen (ör. Boğa kurbağası [*Lithobates catesbeianus* (eski adıyla *Rana catesbeiana*)] Japonya ve Amerika'nın Güneydoğusundaki ölümler Ekim ayında not edilmiştir; (Hoverman vd., 2012; Une vd., 2009).

İkincisi, ranavirüs salgınlarının sonucunda, popülasyonlar ve yerler arasında (görünürde) ölüm olmamasından hayatta kalanların az olduğu ölümlere kadar büyük bir değişkenlik vardır.

2.1.11. Ranavirüs Salgınlarının Görünen Mevsimselliğine İlişkin Açıklamalar

Ranavirüs salgınları genel olarak ilkbaharın sonlarında veya yazın ortalarına doğru ortaya çıkar ve haftalar içerisinde de başlayıp bitebilir (Langdon ve Humphrey, 1987; Green vd., 2002; Grizzle ve Brunner, 2003). Ranavirüs ölümlerinde gözle görülen mevsimselliği ve hızlılığı açıklayabilecek, birbirini dışlamayan dört hipotez vardır. Bunlardan ilki, bu model sahte olabilir ve bir algılama önyargısından kaynaklanabilir. İkincisi, ölümler, ranavirüsün popülasyonlara yılın başlarında girmesinin ardından yatan salgın dinamikleri basitçe yansıtabilir. Üçüncüsü, yaz aylarına denk gelen belirli gelişim aşamalarında konakçılar ranavirüs enfeksiyonlarına karşı daha duyarlı hale gelebilir. Son olarak, bu olaylar yaz aylarında sıcaklıklar yükseldiğinde meydana gelebilmektedir.

2.1.12. Tespit Yanlılıkları

Ranavirüs ölümlerinin metamorfoz amfibi üyeleri ve geç dönem larvaları içerdiğine dair sık gözlemler (Green vd., 2002) daha kolay gözlenebildikleri metamorfozu tamamlamak için sığ suya hareket eden metamorfların bir artefaktı olabilir. Benzer bir şekilde, çok sayıda genç balık, insanların uğrak yerleri olan kıyıların yakınında kümelenme eğilimi göstermektedir, bu sayede kırmızı yüzgeçli levrekte EHNV'nin ilk tespiti kolaylaşmıştır (Whittington, 2010). İnsanların aktif olarak bulunmadığı yerlerde ve zamanlarda ve tespit edilemeyen türlerdeki ölüm olayları fark edilmeyebilir. Örnek olarak, ranavirüs kaynaklı kaplumbağaların morbidite ve mortalitesi, bu hayvanların gizli yapısı göz önünde bulundurulduğunda genellikle gözden kaçabilir (Farnsworth ve Seigel, 2013). Bununla beraber, yaz aylarının ortalarında hızlı ölüm başlangıcı genel modeline uyan birçok ranavirüs salgını, iyi çalışılmış, sık ziyaret edilen popülasyonlarda gözlemlenmiştir.

2.1.13. Mevsimsel Girişler ve Ranavirüs Enfeksiyonunun Sıklığı

Ranavirüs ölümlerindeki hızlı başlangıç ve mevsimsellik, virüsün yılın ilk aylarında ortaya çıkmasının ardından enfeksiyon insidansındaki hızlı artışı yansıtıyor olabilir. Bir hipotezde ise amfibilerde gözlemlenen ranavirüs salgınlarının, subletal enfekte yetişkinlerin, üreme alanlarına döndüğünde başlamasıdır (Brunner, 2004). Yetişkinler, yer ve zamanda örtüşüyorsa, enfeksiyonları doğrudan aynı türe ait larvalara veya başka türlerin larvalarına bulaştırabilir veya tekrarlayan bir enfeksiyondan ölürlere ve larvaları besleyerek tüketirlerse dolaylı olarak bulaştırabilirler. Brunner vd. (2004). Güneybatı ABD'de üreme alanlarına dönen bazı yetişkin kaplan

semenderlerinin (*Ambystoma mavortium*) *Ambystoma tigrinum* virüsü (ATV) ile enfekte olduğu bulundu. Aynı şekilde, yakın tarihte yapılan bir araştırmada, erkek ağaç kurbağalarının (*Lithobates ransylvaticus* ABD'nin doğusunda subklinik enfeksiyonların bulunduğu üreme alanlarına geri dönen (JLB, EJ Crespi ve S. Hall, Washington Eyalet Üniversitesi; S. Duncan, NM Mattheus ve L. Rissler, Alabama Üniversitesi, yayınlanmamış veriler) yetişkinlerden veya karkaslardan bulaşma yoluyla yayılma, sonraki larva dönemi salgınlarını tetikleyebilir. Bu sebeple, ranavirüs enfeksiyonunun dinamikleri, diğer birçok bulaşıcı hastalıkta olduğu gibi benzer olabilir (Keeling ve Rohani, 2008), enfeksiyon ender olduğu ve salgın arttıkça hızlandığı için yayılma alanına girişten itibaren yavaşça yayılıyor. Amfibilerdeki ranavirüs enfeksiyonları genellikle mortal olduğu için ve genel olarak laboratuvar ortamında yaşanan zorluklara maruz kalındığından günler hatta haftalar içinde (Gray vd., 2009; Hoverman vd., 2011), ölüm oranının, enfeksiyonu diğer çalışmalara nispeten kısa bir gecikmeyle takip etmesi beklenir.

Vahşi doğada ölüm olaylarının gerçek zaman akışı daha hızlı görülebilir çünkü bir salgında daha önce ölen bu birkaç bireyi tespit etmek zordur çünkü bunlar küçüktür, çabuk bozulur veya atılır. Olay, ancak çok sayıda ölü hayvan olduğunda (ve belki de çöpçülerin doyurulduğu zaman) belirgin hale gelir. Dahası, bulaşıcı karkasların

birikmesi bulaşmayı kolaylaştırabilir (Pearman vd., 2004; Arp ve Petranka, 2006; Brunner vd., 2007) ve dahi salgının hızını artırıyor olabilir. Amfibilerde bu hipotezin bir miktar desteği vardır.

Todd-Thompson (2010) ABD'nin güney Appalachian Dağları'nda bir sulak alanda yaşayan amfibi topluluğunda ranavirüsler için yaptığı uzunca araştırmasında tipik bir salgın eğrisi gözlemledi. Ranavirüs, larvaların %20'sinin enfekte olduktan yirmi gün sonra ambystomatid larvalarının ölümüyle aynı zamana denk gelen %80'lik yüksek bir seviyeye yükseldiği Nisan ayı sonuna kadar tespit edilememiştir. Torrence ve arkadaşları tarafından toplanan benekli koro kurbağası (*Pseudacris clarkii*) kurbağa yavrularında enfeksiyon belirtilerinin prevalansındaki hızlı artış (2010) bu modelle de tutarlıdır. Ölüm olayları genellikle yüksek enfeksiyon prevalansı ile çakışmaktadır (Bollinger vd., 1999; Greer vd., 2005; Fox vd., 2006; Kik vd., 2011; Hoverman vd., 2012; Homan vd., 2013; Titus ve Yeşil, 2013). Bazı ranavirüs- konak sistemlerinde, enfeksiyon prevalansı, hastalığın oluşumuyla bağlantısız olabilir. Greer vd. (2009), örneğin, kaplan semenderlerinde (*A. m. nebulosum*) ATV enfeksiyonunun Kuzey Arizona'daki üç havuzda ~% 50 prevalansta zirveye yükseldiğini, ancak herhangi bir hastalık veya ölüm gözlenmediğini bulmuşlardır. Yine benzer bir şekilde, Duffus vd. (2008), ağaç kurbağası kurbağa yavrularının% 20- 32'sinin yazın ilk aylarında enfekte olduğunu, fakat hiçbirinin de klinik hastalık belirtisi göstermediğini ortaya koymuşlardır. LMBV ayrıca genellikle morbidite veya mortalitenin yokluğunda bulunur (Hanson vd., 2001; Grizzle ve Brunner, 2003; Grocock vd., 2008; Southard vd., 2009). Bu sebeple, ranavirüslerin konakçı popülasyonları üzerindeki etkilerini anlamak için birden çok zaman noktasında konakçı popülasyonlar hakkında hem epidemiyolojik hem de demografik verilerin toplanması önemlidir (Gray vd., 2015).

2.1.14. Geliştirme Boyunca Duyarlılık

Gençlerin ranavirüs enfeksiyonlarına yetişkinlere göre daha duyarlı olduğuna dair sık gözlemlere ek olarak (Cullen vd., 1995; Ariel, 1997; Cullen ve Owens, 2002; Bang Jensen vd., 2011), yaz aylarına denk gelen belirli geliştirme aşamalarında konakçılar ranavirüs enfeksiyonlarına karşı savunmasız hale gelebilir. Amfibilerde,

ranavirüslerden kaynaklanan ölüm olayları, metamorfoza yakın veya metamorfoz geçiren kişilerde sıklıkla bildirilmiştir (Speare ve Smith, 1992; Yeşil ve Converse, 2005; Greer vd., 2005). Amfibi metamorfozu enerji açısından maliyetlidir ve bir doğal bağışıklık bastırma dönemi gerektirir (Rollins-Smith, 1998; Carey vd., 1999). Metamorfoz anuranlar, ranavirüs enfeksiyonuna karşı özellikle savunmasız oldukları varsayılmaktadır. Bu, hem yaz aylarında amfibilerde ranavirüs ölümlerinin meydana gelmesini hem de hızlarını açıklayabilir (örneğin Gahl ve Calhoun, 2010). Warne vd., 2011) ranavirüse maruz kalan ağaç kurbağası iribaşlarında ölüm olasılığının Gosner'daki her artışla 1.7 kat arttığını buldu (1960). Geliştirme aşaması. Tahta kurbağası larvalarının daha sonra geliştirilmekte olan ranavirüse karşı daha yüksek duyarlılığı, aşamaya özgü duyarlılığı kullanarak yaz aylarında ölüm olaylarının zamanlamasını doğru bir şekilde tahmin eden epidemiyolojik bir modelle desteklenmiştir (Warne vd., 2011). Tüm aşamalar eşit derecede duyarlı olsalardı, ağaç kurbağası popülasyonlarında görülen ölüm, ilkbaharda meydana gelirdi. Ayrıca ranavirüse duyarlılığın amfibi gelişim aşamaları arasında farklılık gösterdiğini, ancak metamorfozun her zaman en duyarlı aşama olmadığını buldu. Bu nedenle, metamorfoz oluşumu, amfibi topluluklarında ranavirüs salgınlarının zamanlaması için evrensel bir açıklama değildir.

2.1.15 Ranavirüslerde Alt Aile Sınır Kriterleri

Iridoviridae familyası içindeki iki alt aile ,birincil konakları tarafından ayırt edilir. Alphairidovirinae üyeleri esas olarak ektotermik omurgalıları (kemikli balıklar, amfibiler ve sürüngenler) enfekte ederken, Betairidovirina'nın üyeleri çoğunlukla omurgasızları (böcekler ve kabuklular) enfekte eder. Ayrıca, ikinci alt ailenin üyeleri daha düşük G + C içeriğine sahip daha büyük genomlara sahip olma eğilimindedir.

2.1.16 Ranavirüslerde Cins Sınır Kriterleri

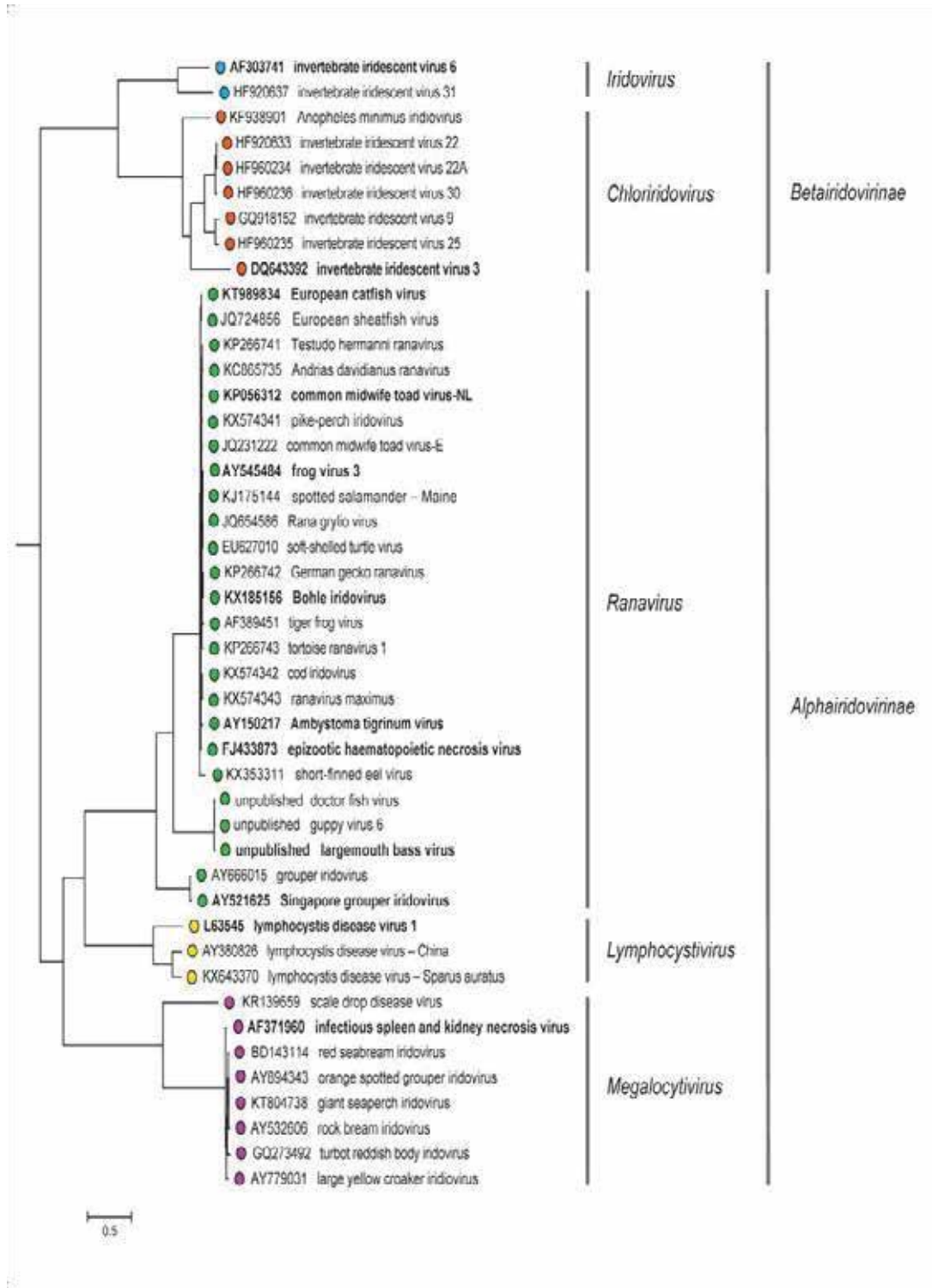
Aile içindeki beş cinsin üyeleri, nükleotit / amino asit sekans kimliği, konak aralığı, G + C içeriği, filogenetik ilişki, genom eş doğrusallığı, hastalık belirtileri ve antijenite ile

ayrıt edilir. Aynı cins içerisindeki türlerin üyeleri genel olarak ortak bir çekirdek genler dizisinde % 50'den fazla dizi kimliği gösterir.

2.1.17 Ranavirüslerde Aile İçi Filogenetik İlişkiler

Bireysel genlere veya ailenin tüm üyeleri için ortak bir birleştirilmiş 26 gen grubuna dayanan filogenetik analizler (Şekil 6. Iridoviridae), ailenin iki alt familya ve beş cinse bölünmesini destekler (Chinchar vd., 2011; Jancovich. vd., 2015). Bir cins içindeki virüsler genellikle nükleotit ve amino asit seviyelerinde %50'den fazla özdeşliği paylaşır. Ayrıca %90'dan fazla dizi kimliği sergileyen virüsler, aynı türe ait olabilir veya aynı türe ait izolatlar / suşlar olabilir.

Örneğin, ranavirüsler FV3, ATV ve EHNV, %90 sekans özdeşliği gösterir, ancak konak aralığı ve genomik organizasyonda farklıdır ve bu nedenle aynı türün farklı izolatlarından ziyade ayrı türler olarak görülür. Ayrıca, Ranavirus cinsi içinde hali hazırda tanınan sekiz tür üç ayrı filogenetik kümeye ayrılır Iridoviridae megalositirivirüsler iki kümeye düşerken lenfositivirüsler iki veya üç kümeye düşmektedir. Sonuç olarak, bu cins içindeki halihazırda tanınan viral türlerin durumu, konakçı aralığı, gen sırası, spesifik genlerin varlığı veya yokluğu, nükleotit ve amino asit dizisi kimliği ve antijenisite gibi kriterler dikkate alınarak yeniden değerlendirilmektedir.



Şekil 2.5. Iridoviridae : Iridoviridae familyasının filogenetik analizi

2.2. Chytridiomycosis ve Batrachochytrium Dendrobatidis

Yunan dilinde batrachos (kurbağa) ve chytra (toprak çömlük) kelimelerinden türetilirken, spesifik epitet patojenikliğin orijinal teyidinin yapıldığı kurbağa cinsinden türetilmiştir (Dendrobates). Dendrobatidis Yunan dendronundandır, "ağaç" ve yarasalar, "tırmanan biri", zehirli dart kurbağası cinsine atıfta bulunur. Bd veya amfibi chytrid mantarı olarak da bilinir, amfibilerde chytridiomycosis hastalığına neden olan bir mantardır. Lee Berger tarafından 1998'de keşfedilmesinden beri hastalık, Holosenyok oluşunun bir parçası olan çoklu yok oluşlara doğru küresel bir düşüşle dünyadaki amfibi popülasyonlarını harap etti. Yakın zamanda tanımlanmış ikinci bir tür olan B. salamandrivorans semenderlerde chytridiomycosis ve ölüme de neden olur.

Nature dergisinin bir haberine göre, chytridiomycosis hastalığına neden olan mantar patojenleri kurbağaların, kurbağaların ve diğer amfibilerin derisini tahrip ederek su ve tuz dengelerini bozar ve sonunda kalp yetmezliğine neden olur.

Bazı amfibi türlerinin Janthinobacterium lividum ile simbiyoz nedeniyle chytridiomycosis enfeksiyonuna dayanmak için doğuştan gelen bir kapasiteye sahip olduğu görülmektedir. Genellikle yenik düşen türler içinde bile, bazı popülasyonlar hayatta kalır, muhtemelen türlerin bu özelliklerinin veya alellerinin evrimsel seleksiyonumuz kaldığını gösterir. Chytridiomycosis, dünya çapında > 200 amfibi türünün ciddi bir şekilde azalması ve tükenmesiyle sonuçlanmıştır ve bilinen herhangi bir hastalığın biyolojik çeşitliliği için en büyük tehdidi oluşturmaktadır. Bu mantar hastalığının şu anda Batrachochytrium dendrobatidis'in, omurgalı konakçılarını parazitileştirdiği bilinen Chytridiomycota'nın tüm filumlarındaki tek türün neden olduğu bilinmektedir.

Biz ikinci oldukça uzak, chytrid patojen keşfini açıklamak Batrachochytrium salamandrivorans sp. nov. semenderlerin ölümcül cilt enfeksiyonlarına neden olur ve bu durum Kuzeybatı Avrupa'daki semender popülasyonlarında dik düşüşlere neden olur. Bulgumuz, mevcut küresel biyolojik çeşitlilik krizinin simgesi olan amfibi biyoçeşitlilik kaybı olgusu için başka bir açıklama sunacaktır.

Patojenler arasında *Batrachochytrium dendrobatidis* global düzeyde amfibi ölümleri ile yakından ilişkili olduğu bilinen Chytridiomycosis etkeni olarak bilinmektedir (Berger vd., 1998; Bosch vd., 2001; Rachowicz vd., 2006). Chytridiomycosis gelişmekte olan bulaşıcı amfibi hastalığı başlığı altında tanımlanmıştır (Daszak vd., 2000). Hastalık ajanı olarak nonhifal zoosporik patojenite etmeni fungus olan ve konak özgüllüğü düşük *Batrachochytrium dendrobatidis* türü olarak bildirilmiştir (Daszak vd., 2003). Amfibilerin azalış şablonu ve genetik çalışmalar chytrid fungusunun Orta Amerika ve Avustralya'da doğal populasyonlara bulaştığı görüşünü desteklemiştir (Daszak vd., 1999; Morehouse vd., 2003). Fungusla ilişkili çalışmalarda yeni patojen hipotezi ve endemik patojen hipotezinin sonucu olarak hastalığın bilinen yaygınlığını açıklanmıştır (Goka vd., 2009). Chytridiomycosis, dünyadaki amfibi türlerinin azalmasına ve yok olmasına sebep olan ölümcül mantar hastalığıdır. Henüz yapılan çalışmalarda, chytridiomycosis için kullanılan moleküler tarama testleri yakın zamanda tanımlanan *Batrachochytrium salamandrivorans* türlerini tespit edememiştir.

Bu çalışmada, *B. salamandrivorans* ve *Batrachochytrium dendrobatidis*'in eşzamanlı tespiti için dubleks gerçek zamanlı PCR sunuyoruz. İle *B. dendrobatidis* ve *B. Salamandrivorans* Spesifik primer ve probler, amfibi örneklerde iki patojenin saptanması, PCR başına her iki patojenin 0.1 genomik eşdeğer zoosporunun tespit limiti ile mümkündür. Geliştirilen gerçek zamanlı PCR, *B. dendrobatidis* ve *B. salamandrivorans* için yüksek derecede özgüllük ve hassasiyet, yüksek lineer korelasyonlar ($r^2 > 0.995$) ve yüksek amplifikasyon verimleri (>% 94) gösterir. *Batrachochytrium dendrobatidis* yakın zamana kadar *Batrachochytrium* cinsinin tek türü olarak kabul ediliyordu. Patojenin chytrid olarak ilk sınıflandırılması zoospore ultrayapısına dayanıyordu. SSUDNA analizi -rDNA, *Chytridium confervae* ile en yakın eşleşme ile görünümü doğruladı. 2013 yılında ikinci bir *Batrachochytrium* türü keşfedildi:

B. salamandrivorans esas olarak semenderleri etkileyen ve aynı zamanda chytridiomycosis'e neden olan *B. salamandrivorans*, *B. dendrobatidis*'ten öncelikle mikrop tüplerinin in vitro oluşumunda, birden fazla sporangia in vivo ile kolonyal thalli oluşumunda ve daha düşük bir termal tercihte farklıdır. Sonuç olarak, tarif edilen çift yönlü gerçek zamanlı PCR, yüksek oranda tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlarla *B.*

dendrobatidis ve *B. salamandrivorans* DNA'sını saptamak için kullanılabilir (Longcore, Pessier ve Nichols, 1999). Bazı patojenler yüksek oranda konakçıya özgü olmasına rağmen, çoklu konak türlerini enfekte edenler, patojenlerin kalıcılığını, virülansını ve konakçı popülasyonları arasındaki hareketi artırarak hastalık dinamiklerini derinden etkileyebilir. Ayrıca, bir patojen için çok sayıda konak olduğunda, bazıları rezervuar konakları olarak işlev görebilir.

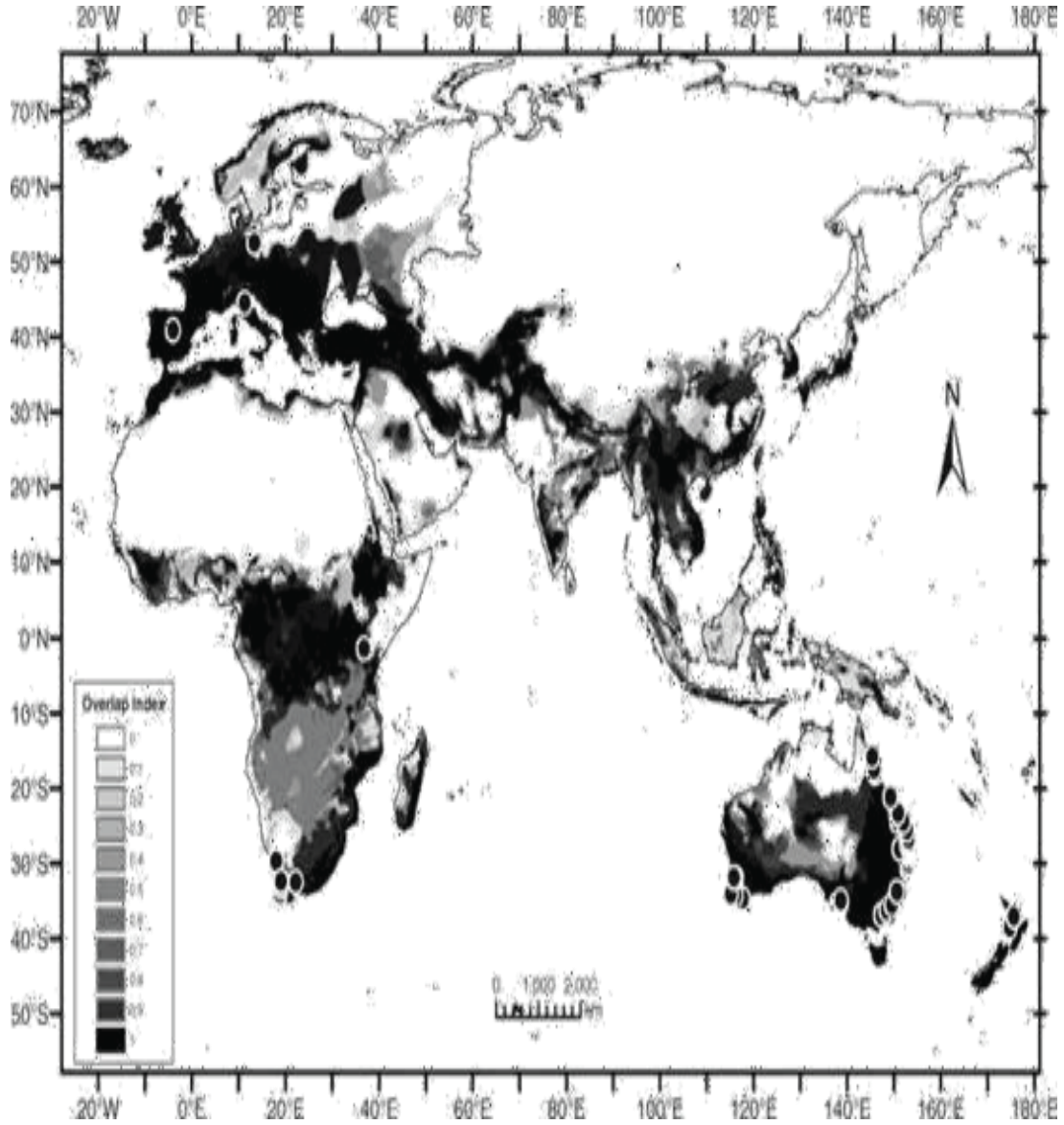
Rezervuar konakçıları, ilgilenilen belirli konakçıların bulunmadığı veya enfeksiyona geçici olarak dirençli olduğu ve patojenlerin diğer konakçı popülasyonları veya türlerinin tükenişini sürdürebilmesi için sıklıkla gerekli olduğu zaman paraziti koruyabilir. Chitrid mantarı *Batrachochytrium dendrobatidis*, putativ olarak konakçı tükenmelere neden olan bir parazit örneğidir. Nitekim, dünya çapında yüzlerce amfibi türünün yok oluşuna sebep olmuştur. *B. dendrobatidis*, amfibi konakların olmadan ayakta durmasını sağlar ve bu da amfibi tekrar yapılanmaları başarılı bir şekilde önleyebilir. Kalıcılık için olası bir mekanizma, *B. dendrobatidis*'in amfibi olmayan konakçılarının varlığıdır.

B. dendrobatidis, genellikle tripton gibi keratinize edilmemiş ortamlarda laboratuvarında tutulmasına rağmen, sustenance için konakçı keratini tüketen bir amfibi uzmanı olarak düşünülür. Çok sayıda omurgalı ve omurgasız taksonları gastrointestinal (GI) kanallarında keratin veya keratin benzeri bileşiklere sahiptir. Bu nedenle, önceki araştırmacıların, *B. dendrobatidis*'in amfibi olmayan konakçıları ya da vektörleri olabileceğini varsaydığı şaşırtıcı değildir. Bu konaklardan amfibilere, ve amfibi olmayan konaklar ile *B. dendrobatidis* arasındaki alanda bağlantı vardır.



Şekil 2.7: B. dendrobatidis patojenin global dağılım haritası (İnt.Kyn.3).

Çalışmalar neticesinde B.dendrobatidis rakım olarak 400 m üzeri yüksekliklerde daha sık karşılaşılmadığına sebep anlaşılmıştır (Berger et al. 2004, McDonald et al. 2005). İklim değişikliği (sıcaklık, rüzgarlar, nem ve yağış oranları gibi) etkisiyle süratle yayılım gösterdiği tespit edilerek, potansiyel riskli bölgeler ve ekolojik nişleri haritalandırılmıştır. Resimden anlaşıldığı üzere Anadolu yüksek risk altında bulunan bölgelerin başında gelmektedir.



Şekil 2.8: *B. dendrobatidis* için öngörülen temel ekolojik niş haritası. Koyu bölgeler *B. dendrobatidis* ekolojik niş alanı için uygun olan bölgeler (Ron 2005; Kriger ve Hero, 2009).

Chytridiomycosis *B. dendrobatidis*in cilt enfeksiyonuna bağlı bir hastalık olduğu bilinmektedir. Chytrid'in oluşması suyla taşınmış olan zoosporların anur larvalarında ağız kısımlarında parazit temasıyla amfibilerin post metamorfik safha sırasında enfeksiyona maruz kaldıkları bildirilmiştir fakat bazı koşulların sağlandığı durumlarda larval evredeki kaudatlar üzerinde oluştuğu da tespit edilmiştir (Brodman ve Briggler, 2008; Kriger ve Hero, 2007; Berger vd., 1998; Longcore vd., 1999; Marantelli vd., 2004).

B. dendrobatidis enfeksiyonları patofizyolojik değişimlerle yakından ilişkilidir ve bu değişimler hastalık durumunda (chytridiomycosis) öncülük eder yahut potansiyel ölümlere sebep olur. Chytridiomycosis oluşmasından sonra, amfibi epidermisi üzerindeki elektrolit taşınımı %50'ye kadar indirgenmiş olur, sodyum ve potasyumun hücre sitoplazmasında gözlenen derişimi düşmesiyle ve asistolik kalp durması sonucunda ölümler gerçekleşebilmektedir (Voyles vd., 2007). Deri sağlamlığı amfibi homeostazisindeki korunmada oldukça önemli faktörlerden biridir, deri fonksiyonunu tahribatının doğrudan B. dendrobatidis'in ürünlerinin bir mekanizması sonucu olduğu düşünülmektedir. Filogenetik uzaklıktaki amfibilerde hastalık ve yok olma etkeni olabileceği varsayılmaktadır (Voyles vd., 2007). Batrachochytrium dendrobatidis kurbağaların tümüyle biyolojisini değiştirdiği gibi aynı zamanda enfekte durumda olan bireyin büyümesini de etkilediği belirlenmiştir (Lips vd., 2008; Bosch vd., 2007; Skerratt vd., 2007; Laurance, 2008; Rohr vd., 2008). Aynı zamanda amfibilerin tüm gelişim evrelerinde görülen bu etken ölümlere de neden olmaktadır. B.dendrobatidis zoosporlar su aracılığıyla bir hayvandan diğerlerine bulaşmakta ve amfibilerin derisini enfekte etmektedir. Ayrıca bu zoosporlar sadece epitelyumun keratinize olmuş olan bölümünde büyümektedir (Berger vd., 1998; Longcore vd., 1999; Pessier vd., 1999; Nichols vd., 2001). Zoosporlar 24 saat içinde hareketli forma dönüşmektedirler (Berger 2001). Zoosporlar hem yetişkin hem de iribaş safhada olan (bu safhada sadece ağız parçalarında tespit edilmiştir) kurbağaları enfekte eder (Berger vd., 1999; Nichols vd., 2001). Enfeksiyondan sonra ölüm genellikle 18 ila 45 gün içerisinde gerçekleşmektedir. Enfekte olan amfibi bireylerinde deride kızarıklıklar ve lekelenmeler, ülser ve nekroz oluşumu bildirilmiştir, ek olarak refleks kaybı gibi nörolojik etkilere de sebep olur. Doku üzerindeki hücreler arasında zoosporların görülmesi ilk olarak Berger vd. (1998) tarafından bildirilmiş olup altın standart olarak belirtilmiştir.

Yapılan çalışmalardaki histolojik veriler moleküler yöntemlere nazaran daha az hassasiyete sahiptir. Özellikle klinik bulgu göstermeyen enfeksiyonlar için moleküler çalışmaların ne kadar önemli olduğu burada ortaya çıkarmaktadır (Hyatt vd., 2007). Boyle vd. (2004) ve Hyatt vd. (2007). Moleküler yöntemler kullanarak amfibilerde Bd toksininin belirlenmesi için detaylı bir protokol oluşturmuşlardır ve günümüzde bu

protokolün güvenilir olduğu kabul edilmiş olup yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir.

2.2.1. Batrachochytrium Dendrobatidis Familyası

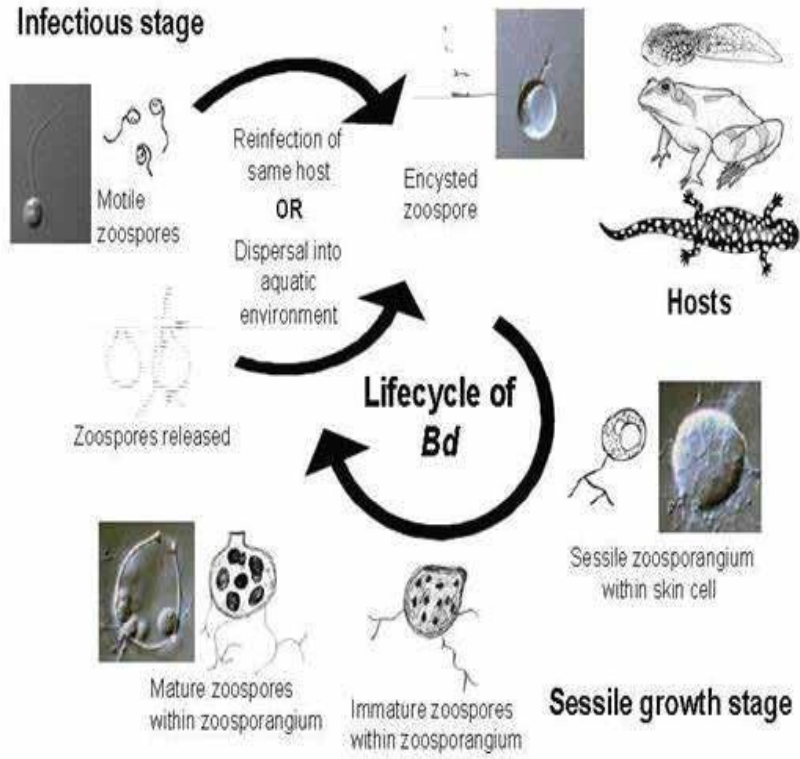
Batrachochytrium dendrobatidis (Bd) Chytridiomycota şubesine, Chytridiomycetes sınıfına, Chytridiales takımına üyedir (Hyatt vd., 2007). Chytridiomycota şubesinin üyeleri global yayılım göstermekte olan heterotrofik funguslar olarak bildirilmiştir (Sparrow, 1960; Karling, 1977). Doğada toprakta ve suda bulunabilmektedirler. Canlılar üzerinde ise kitin, keratin ve bitki kalıntıları gibi yüzeyler aracılığıyla çürükçül (saprofit) davranış gösterdikleri bilinmektedir. Fakat bazı cinsleri fakültatif ya da obligat anaeroblar olarak bilinir. Çoğunlukla mantarlar ve alglerin, tohumlu bitkilerin yanı sıra rotiferlerin, nematodların yahut böceklerin zorunlu (obligat) parazitlerini oluştururlar. Batrachochytrium dendrobatidis Chytridiomycota şubesine ait omurgalı filumunun bir paraziti olarak kabul görmüş olan ilk üyesi olarak bildirilir (Barr, 1990).

B. dendrobatidis Sucul Hayvan Sağlığı Standartları Komisyonu (OIE) tarafınca amfibi hastalıkları grubuna özel öneme sahip iki patojenden birisi olarak kabul edilmiştir (Diğeri ise yine bu tez çalışmasında yer alan İridoviridae familyasının ranavirüs cinsidir) (OIE, 2006).

2.2.2. Batrachochytrium dendrobatidis Yaşam Döngüsü

Batrachochytrium dendrobatidis (Bd)'in yaşam siklusu iki temel basamaktan oluşmaktadır. İlki hareketli safha olarak adlandırılır ve bu safhada zoosporlar su vasıtasıyla taşınabilmektedir ve konaklara ulaşabilmektedir. Bahsi geçen hareketli safhada zoosporlar çok kısa ömürlüdürler. İkinci safha ise zoosporangium (sporangium olarak bilinir) içinde çoğalıp gelişebildikleri durağan safhadır. Bu safhada ise eşeysiz üreme için monosentrik olan tallus zoosporangium içerisinde bulunmaktadır. B. dendrobatidisin konağını katlanmış deri epiteline gömülmek ve buraya uyum sağlamak suretiyle epidermis hücrelerinin içerisinde yaşamaya başlar. İlk aşamada parazit birkaç tabaka derinliktedir. Gelişme ve büyüme hızlarıysa hücrenin

gelişim hızı ile çakışır. *B. dendrobatidis* ilk olarak canlı hücreler içerisinde gelişimini tamamlar ancak *B. dendrobatidis*'lerin gelişimini zoosporangia olarak bilinen ölü aynı zamanda yüzeysel biçimde keratinize olmuş hücreler vasıtasıyla gerçekleştirmiş olur. Zoosporangia yüzeyinde vücudun distal kısmına açılan bir boşaltım kapağı sayesinde zoosporlar çevreye yayılmaktadırlar. Erişkin ve iribaşlarda sporangia dağılımı; *B. dendrobatidis* parazitik faaliyetlere başladığında tabakalaşmış ve keratinize epidermise ihtiyaç duyar halde olduğunu göstermiştir (Berger vd., 1998). Genç sporangialardan bahsedecek olursak daha derinlerdeki prekeratin içeren hücreler içinde gelişebilirler. Kültür ortamında ve deri üzerindeki yaşam döngüsü aynıdır. İn-vitro ortamdaki yaşam döngüsü 22 derecede 4 ila 5 gün sürmektedir. Dirençli dinlenen sporlar bulunmamıştır yani *B. dendrobatidis* sporlarının dinlenme (uyku) fazı yoktur (Berger, 2005). 25 derece üzerinde epidermal sirkülasyon oranı artarken *Bd* büyüme hızı düşer (Piotrowski, 2004). Bu sayede sıcaklık artarken enfeksiyon kaybı görülür (Berger, 2004; McDonald, 2005). *Bd*'in farklı sıcaklık ve yağış rejimi gibi geniş aralıktaki çevre koşullarında yaşayabildiği gözlemlenmiştir (Ron, 2003). *Bd*'in laboratuvar koşullarındaki en elverişli gelişme sıcaklığı 17-25 derecedir. 28 derecede organizma gelişimi durur ve 29 derecede yaklaşık bir hafta içinde ölür (Longcore, 1999; Piotrowski, 2004).



Şekil 2.9: Bulaşıcı ve sesil büyüme aşamalarını gösteren *Batrachochytrium dendrobatidis*'e ait yaşam döngüsü (Rosenblum vd., 2010).

2.2.3 *Batrachochytrium Dendrobatidis* Kökeni

B. dendrobatidis patojeni konak dinamiği göz önüne alındığında çevre faktöründeki değişimlerin etkisi altındayken daha fazla ölümcül hale gelmiştir (endemic pathogen hypothesis (EPH) (Fisher vd., 2009). *B. dendrobatidis*'in kısmi yayılışlar gösterdiği yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. Bu salgının yayılış yönleri (cepheleri) Avustralya, Orta ve Güney Amerika'da tanımlanmıştır. Chytridiomycosis yayılımının iki atasal merkezi olduğu öne sürülmüştür; İlki Afrika dışına uzanan ve yapılan *Xenopus* cinsi olarak adlandırılan Afrika pençeli kurbağa türünün ticaretidir (Weldon, 2004). İkincisi ise Kuzey Amerika'da Amerikan Bullfrog (*Lithobates catesbeianus* / *Rana catesbeiana*) ticaretlerinin gerçekleştirililiyor olmasıdır (Fisher ve Garner, 2007; Garner vd., 2006). Fungusun geçmişteki varlığının tespiti Afrika'daki 697 *Xenopus* türünün incelenmesiyle *Xenopus laevis* türü üzerinde belirlenmiştir ve ancak bu sayede *B. dendrobatidis*'in Afrika kökenli olduğu hipotezini destekleyici türden epidemiyolojik ispatlar bulunmuştur. Başka bir bakış açısıyla yapılan bu çalışma beraberinde Afrika'dan farklı bölgelerde tespitinin sağlandığı hastalığın ilk verisinden

23 yıl evvel *B. dendrobatidis*'in Afrika kıtasında var olmuş olduğu ortaya çıkarılmıştır (Weldon, 2004).

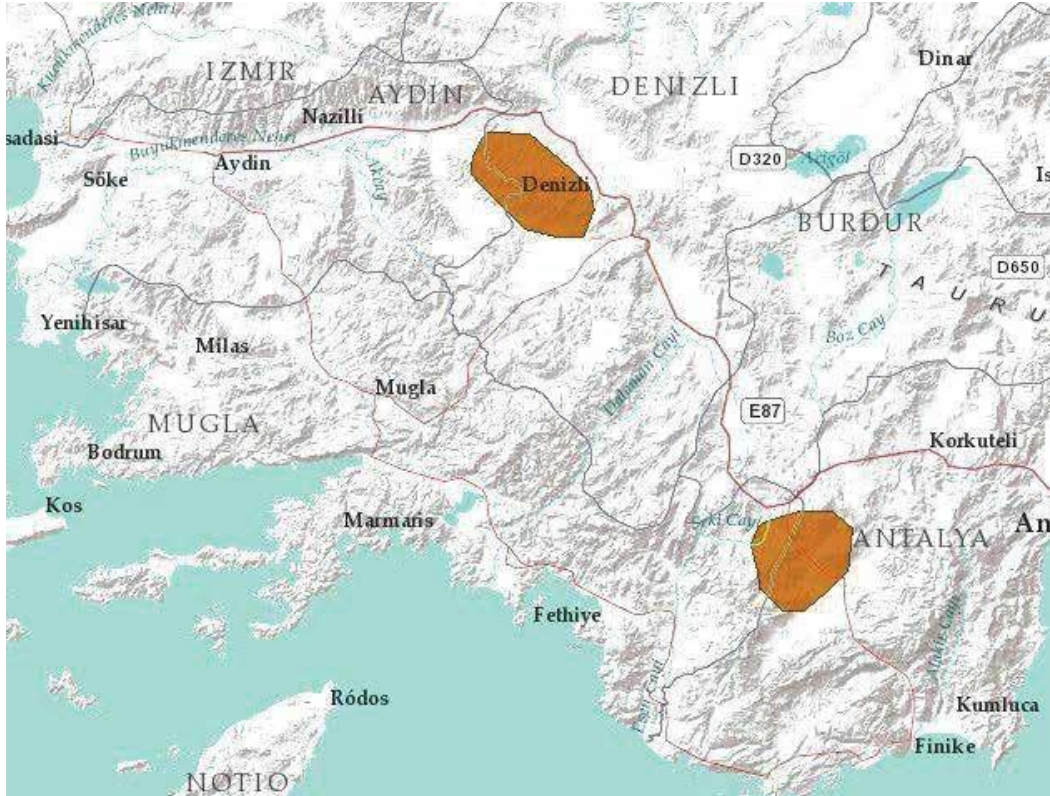
Tüm veriler incelendiğinde *B. Dendrobatidis* fungusunun güncel dağılışı alanı bilinmekte olan ve bilinmeyen hareketinden dolayı 20. yüzyıl başlarında taşıyıcı olarak tanımlanan organizmaların popülasyon kaynağı bilinmemektedir (Fisher, 2009). Morgan vd., 2007), Sierra Nevada bölgesinde amfibi türlerinin azalışları üzerinde yapılan araştırmalarda NPH tezini destekleyici nitelikte sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçların göstermiş olduğu düşük seviyede çeşitlilik, amfibi konak spesifikliğinin olmayışı, fungusun genotipi ve coğrafya ile düşük korelasyon göstermesi, tek fungusa bağlı genotip, endemik kurbağa yok oluşları ve antropojenik kaynaklı fungus göç hareketinin kanıtlarını oluşturur. Bunun yanı sıra endemizim sayesinde (EPH), yerel ölçekte canlı gruplarının yeniden birleşmesinde birtakım farklılıklar bulmuşlardır. Bu nedenle birlikte amfibi azalışlarını hastalık salgınının yanı sıra endemizmin tek başına açıklayamayacağını belirtmişlerdir (Goka vd., 2009; Walker vd., 2010) tarafından desteklenen “yeni patojen hipotezi” ile “endemik patojen hipotezi” arasında bir kombinasyonlar mevcuttur ve bu kombinasyonlar salgın varlığını ve salgının durumunu açıklar nitelikte bir hipotezi önermişlerdir ve NPH *B. dendrobatidis*'in İberya'da ortaya çıkmasıyla tutarlıdır yargısına varmışlardır. Ayrıca EPH benzer süreçler, hastalık gelişiminin popülasyon düzeyinde olan sonuçlarını açıklamıştır.

NPH benzeyen süreçlerin ifade edilmesi (*B. dendrobatidis*'in İberya biyomlarına girişi) onun EPH benzeri çevresel koşullara bağımlı olduğunu bulgular desteklemiştir (Chytridiomycosis oluşumu). *B. dendrobatidis*, görülmesi çevre koşullarına bağımlı yeni bir patojen olduğu bildirilmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Rana Tavasensis Arazi Çalışmaları

Tavas kurbağası (*Rana Tavasensis*) Dünya'da yalnızca Güneybatı Anadolu'da yaşayan, endemik bir türdür. Akdeniz Bölgesi'nin Antalya, Burdur ve Isparta'yı içine alan bölgede bu tür IUCN Kırmızı Liste ölçütlerine göre tehlikede (E) altındadır. Anadolu'nun endemik bir türü olan Tavas Kurbağası, Denizli'nin Tavas ilçesinin Kızılcabölük beldesinin Çakıroluk konumunda tespit edilmiştir. Yakın zamanda Elmalı-Fethiye arasında bulunan Girdev gölünde yaşayan kurbağalar da bu türden sayılmıştır. Ancak yapılan arazi çalışmalarında bu türe rastlanamamıştır.



Şekil 3.1: Rana tavasensis dağılım alanı (<http://maps.iucnredlist.org>)

Günümüzde Tavas Kurbağasının bu iki lokalitede bulunduğu bilinmektedir. Tavas kurbağasının karakteristik özellikleriyse genel hatlarıyla sırt bölgesinde açık renkli bir şerit bulundurması ve bu şeridin yan kısımlarında görülen lekelerin iri ve belirli bir simetrik düzende dizilmesidir.



Şekil 3.2.: Kuyuksuz kurbağa türü *Rana tavasensis* (Tavas kurbağası) (Foto: U.C. ERİŞMİŞ)

Fungal (*B. dendrobatidis*)- viral (FV-3) -patojenlerin taşıyıp/taşımadığını tespit etmek amacıyla, 17 kuyuksuz kurbağa türlerine ait örnekler, türün dağılım alanı dikkate alınarak Mayıs 2017 - Ağustos 2019 yılları arasında araştırma gezileri ile sağlanmıştır. Her bir lokalitenin koordinat, yükseklik, havadaki nemi, hava sıcaklığı, suyun sıcaklığı,

suyun pH değerleri kaydedilmiştir. Toplanan *Rana tavasensis* türüne ait örnek sayısı ve örnek toplanan lokaliteler **Çizelge 3.1**'de verilmiştir.

Çizelge 3.1: Çalışmada değerlendirilen toplanan. *Rana tavasensis* örneklere ait eşey sayıları.

Lokaliteler	Örnek Sayısı			Toplanma Tarihi	Coğrafik Koordinatları
	♂♂	♀♀	J.		
	6	1	0	26.04.2017	
1-Tavas (Çamlaraltı)	14	3	0	21.05.2018	29° 4'48.18"D 37°42'33.38"K
	3	1	0	24.06.2019	
2-İnceler	0	0	0	26.04.2017	29°31'15.96"D 37°41'46.95"K
	13	2	0	21.05.2018	
	6	1	0	24.06.2019	
Toplam	42	7	0		

3.2. Örnekleme

Chytridiomycosis tanısında kullanılmak amacıyla örneklemler pamuk uç bulunduran swap çubukları (Medical Wire and quipment, MW 100-100; sourced from Biomerieux) yardımıyla canlının deri yüzeyi üzerinden alınmıştır. İşlem 10 defa kurbağanın dorsal (sırt) yüzeyine, 10 kez her iki koltukaltı ve kasık bölgesine, 10 kez ventral (karın) yüzeyine, 10 kez her kalçanın alt tarafına ve son olarak 10 defa olmak üzere ayaklarınınalt yüzeyine sürülerek yapılmıştır. Swaplama tekniği kullanmamızdaki sebep ise yüzey alanından en fazla miktarda örneklem alınabilmesini sağlamaktır ve negatif sonuç verme ihtimali bu sayede minimum seviyeye indirgenmektedir. Alınmış olan swap örnekleri 2,0 mL'lik sterile edilmiş ependorf tüplere alınarak arazi sırasında azot tanklarında muhafaza edilmiştir. Laboratuvar ortamına getirildikten sonra analizlerin yapılacağı zamana kadar -20 derece'deki soğutucularda saklanmıştır (Kriger vd., 2006).

Ranavirus tanısında kullanılacak örnekler için bulundurulan kaplar içerisinde bulunan epitel deri kalıntıları alınarak %70' lik etanol bulunan 2,0 mL'lik ependorf tüplere konulmuştur. Ayrıca arazi sırası esnasında ölmüş hayvan örneklerinden 0,5 cm²'lik deri ve kas parçaları da alınarak %70' lik etanol bulunan 2,0 mL'lik ependorf tüplere alınmış ve arazi esnasında azot tanklarında saklanmıştır. Laboratuvara getirilen örnekler sonraki safhaada analizlerin yapılacağı zamana kadar -20 derece'de saklanmıştır.

3.3. Laboratuvar Analizleri

Laboratuvar ortamında gerçekleştirilen çalışmalar boyunca örneklerden almış olduğumuz DNA örneklerini ve bu DNA'ların izolasyon kontrolü elektroforez ve Qbit cihaz ölçümleri, Real-Time PCR kullanılarak yapılmış ve sonuçların değerlendirilmesi aşamasına geçilmiştir.

3.4. Elektroforez İşlemi

Bu işlem sırasında Bd ve Ranavirus tespiti için yapılmış olan DNA izolasyonu işlemlerinin ardından, izolasyon işleminin başarıyla gerçekleştirilmesinin ardından işlemin kontrolü amacıyla elde edilen örneklerden bir kısmı % 1'lik agaroz jel üzerinde elektroforez işlemi gerçekleştirildi ve sonra UV ışık altında görüntülenmesi yapıldı.

3.5. Qbit Ölçümleri

DNA izolasyonu işleminin gerçekleştirilmesinin sonucunda elde edilen DNA miktarını ölçmek amacıyla Qbit 2.0 flourometer (invitrogen) yardımıyla yüksek hassasiyete sahip DNA ölçüm kiti kullanılarak (kit protokolü uygulanmıştır) ölçümleri yapılmıştır.

3.6.B. dendrobatidis için DNA İzolasyonu

Alınmış olan swap örnekleri sayısı kadar 2,0 mL'lik vidalı ve kapaklı tüpler hazırlanarak etiketlendi. Etiketlenmiş her bir tüpe 30-40 mg 0,5 mm çapındaki zirkonyum /silika boncuklar konuldu. Sonra üzerlerine 50 µL PrepMan Ultra (Applied

Biosystems #4318930) eklendi ve daha sonra swap örnekleri bulunan swap çubuklarının sapları kesilerek tüplere konuldu. Bütün işlemler tamamlandıktan sonra tüplerde bulunan örnekler BeadBug (Benchmark) cihazı yardımıyla 45 ila 60 saniye boyunca 4000 rpm de homojenize edilerek mevcut zoosporların parçalanması sağlandı daha sonra ise kısa bir süreliğine buz küvetine alınarak soğutulmak üzere bekletildi. Ardından örneklerin bulunduğu tüpler 13 000 xg de 30 saniye santrifüj edildikten sonra homojenizasyon ve santrifüj işlemleri yinelenildi. İşlemlerin ardından tüplerin kapakları 22-23 numara sterilize iğneler kullanılarak delindi. Kontaminasyon (bozunma) olasılığını elemine etmek için her numune için ayrı ayrı sterilize iğne kullanıldı. Kapakları üzerinde delikler açılan örneklerin bulunmuş olduğu tüpler özel tüp tutucularına konularak 10 dakika süreyle kaynamakta olan su banyosunda bekletildi. Su banyosunun ardından alınan örnek tüpleri 2 dakika boyunca oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı ve ardından yüksek bir hızda (~13 000 xg.) 3 dakika +4 derecede santrifüjü sağlandı ve oluşan süpernatant toplanılarak qPCR işlemi için kullanılmak üzere 1/10 oranında sulandırıldı (~5 ng/μL). qPCR çalışmasında DNA izolasyonu işleminden daha ileri bir tarihte yapıldığı durumlarda DNA örnekleri etiketlenmiş steril 0,5 mL' lik tüplerde -20 derecede muhafaza edilmiştir (Boyle, 2004).

3.7. Ranavirus için DNA İzolasyonu

Ranavirüs için çalışmalar sırasında örneklerin koyulduğu kaplardan epitel deri kalıntıları alınmıştır. Numuneler izolasyonu yapılmak üzere %95 oranında etanol ihtiva eden eppendorf tüpler içerisinde fiksasyonu sağlanmıştır. Sonrasında üzerine 400 μL ögütücü tamponu (0,1 M NaCl, 0,5M Sükroz, 0,1 M Tris , 50 mM EDTA, %0,5 SDS) eklenmiştir. Homojenizatör yardımıyla 60-70 sn boyunca 4000 rpm'de homojenize edilmiştir. Elde edilen homejanat 30 dk, 65 derecede inkübe edilmiştir. Ardından 57 μL 8 M potasyum asetat eklenmiş ve 30 dk buz banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra 10 000 xg de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiş süpernatant yeni bir tüpe alınmıştır. Daha sonra her bir tüpün üzerine 1ml buz soğukluğunda %100 etanol eklenerek hafifçe karıştırılmıştır. Daha sonra ise 10 000 xg de 15 dakika santrifüje edilerek DNA çöktürülmüş ve 50 μL TNE (6 mM Tris, 6 mM NaCl ve 0,2 mM EDTA) tampon çözeltisi içinde çözündürülerek +4 derece ve - 20derece sıcaklıkları arasında muhafaza edilmiştir (Galli, 2006).

4. BULGULAR

4.1. Real Time PCR İşlemleri

4.1.1. Real Time PCR ile B. Dendrobatidis Tespiti

Real time PCR işlemi sırasında çalışılmakta olan örneklerin üzerindeki DNA yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla oluşturulacak olan standart eğri PrimerDesign (İngiltere) şirketinden temin edilen Bd DNA örneği 10'ar kat seyreltilerek standart örnekler hazırlanmıştır.

Çizelge 4.1: Standart örneklerin hazırlanması

Dilüsyon Tüpleri	DNA Kopya Yoğunluğu
Standart 1	$2 \times 10^5 / \mu\text{L}$
Standart 2	$2 \times 10^4 / \mu\text{L}$
Standart 3	$2 \times 10^3 / \mu\text{L}$
Standart 4	$2 \times 10^2 / \mu\text{L}$
Standart 5	20 / μL
Standart 6	2 / μL

Pozitif kontrol amacıyla en yüksek yoğunluğa sahip olan Standart 1 örnekleme her Rt-PCR uygulaması için kullanıldı. Negatif kontrol amacıyla da her Rt-PCR deneyi için DNA örneğinin yerine DNaz-RNaz içermeyen sterilize edilmiş su kullanıldı. İzole edilen DNA'lar B. Dendrobatidis'e spesifik primerler (evrensel fungus gen bölgesine ait) ITS1-3 Chytr, 5.8S Chytr primerleri ve Chytr MGB2 TaqMan probu kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu uygulaması gerçekleştirildi (Boyle, 2004).

Çizelge 4.2 *B. dendrobatidis* türüne ait spesifik primerler.

Primer adı		Nükleotid sekansı
ITS1-3 Chytr	29 baz	5'-CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC-3'
5.8S Chytr	22 baz	5'-AGCCAAGAGATCCGTTGTCAAA-3'
Chytr MGB2	15 baz	5'-6FAM CGAGTCGAACAAAAT MGNFQ-3'

B. dendrobatidis'e ait olup olmadığı bu teknik kullanılarak kolay şekilde eş zamanlı bilgisayar görüntüleme sisteminde DNA miktar ölçümü gerçekleştirilmektedir. Real Time PCR aşamasında DNA örneği, *B. dendrobatidis* varlığının tespiti için izole edilen DNA örnekleri *Bd*'ye özgü Real time PCR işleminde reaksiyonların son hacimleri 20 µL (15 µL RT-PCR + 5 µL DNA örneği) olarak ayarlandı.

Çizelge 4.3: Bd tespiti için yapılan qPCR için kullanılmış olan malzeme miktarları.

Kullanılan Malzeme	Kullanılan Miktar	
2 x Precision TM MasterMix (PrimerDesign, İngiltere)	10	µL x örnek sayısı
B. dendrobatidis' e özel Primer/Probe (10 pikomol) mix	1	µL x örnek sayısı
DNAz ve RNAz içermeyen steril su	4	µL x örnek sayısı
Toplam	15	µL x örnek sayısı
DNA örneği (5 ng /µL)	5	µ L
Reaksiyon Toplamı	20	µL

Real-time PCR için hazırlanan örnekler 8'li 0,2 mL strip PCR tüplerine konularak yüzeyler şeffaf seal bant ile kapatılarak karışımın homojenize olması ve tüplerin duvarında kalma ihtimali olabilecek damlaların dibe inmesi için tüm tüpler vorteks/spin cihazı (Bioneer, Kore) yardımıyla 2500 rpm de 5 saniye boyunca “hard” seviyede çalkalama ayarında 20 saniye ve 20 tekrar olmak üzere vorteks/spin edildi. Daha sonra hazır olan tüpler Real-time PCR cihazının (Bioneer exicycler 96, Kore) bloğu üzerindeki kuyucuklara konuldu ve daha sonraki aşamada aşağıdaki protokol gereğince cihaz çalıştırıldı.

Çizelge 4.4: Bd tespiti için qPCR amplifikasyon protokolü (PrimerDesign, İngiltere).

Döngü Sayısı	İşlem Basamağı	Süre (saat.dakika.saniye)	Sıcaklık
1 Tekrar	Enzim Aktivasyonu	00.10.00	95 °C
	Denatürasyon	00.00.10	95 °C
50	Bağlanma- Uzama	00.01.00	60 °C
Tekrar	Verilerin Okunması	-	-
1 Tekrar	Melting	-	55 °C – 94 °C

Bütün örnekler için qPCR işlemleri 3'er defa tekrarlanarak yanlış, negatif ve hatalı pozitif sonuç verme ihtimalleri minimuma indirilmiştir. PCR işleminden sonra Ct (cycle treshold) değeri alınmış örnekleri %1,5 lik agaroz jel elektroforezinde DNA marker kullanılarak yürütüldükten sonra hedeflenen DNA örneği boyutunun görüntülenmesiyle sonuçların doğru olup olmadığı kontrol edilmiştir (Annis, 2004).

4.1.2 Real Time PCR ile Ranavirüs Tespiti

Ranavirus varlığının tespitinde real time, quantification PCR (qPCR) uygulama işlemi, MCP (Major Capsid Protein) ve IE (immediately early) primerleri kullanılarak belirtilen protokol koşulları altında reaksiyon son hacmi 25 µl (10 µl Applied master mix, 10 pikomol 1 µl ileri primer, 10 pikomol 1 µl geri primer, 8 µl DNaz – RNaz içeriği bulunmayan sterilize su ve 5 µl (25 ng) DNA) eklenmesiyle gerçekleştirildi. Çalışılan

tüm örneklerin qPCR işlemleri 3 kez tekrarlanarak yanlış negatif ve hatalı pozitif sonuç verme ihtimalleri minimum seviyeye indirilmiştir. qPCR işleminden sonra Ct (cycle treshold) değeri alınan örnekler %1,5 lik agaroz jel elektroforezi yardımıyla DNA markerlar kullanılarak yürütülerek hedef DNA örneği boyutunun görüntülenmesiyle sonuçların doğruluğu kontrol edilmiştir (Galli, 2006).

Çizelge 4.5: Ranavirus (FV-3) tespitinde kullanılan pimer dizileri (Galli *et al.* 2006).

Primer Adı	Gen yeri	Üzerindeki Nucleotide sequence
MCP ileri	61–81 ^a	5' - TAC TTT GTC AAG GAG CAT TAC - 3'
MCP geri	398–418a	5' - TCA TGT TAT AGT AGC CTA TGC - 3'
IE ileri	104–22b	5' - ATG ATC CAA GCC TACCTG TGC - 3'
IE geri	563–583b	5' - AAA TGT CCT AAT CTA TAC ACC - 3'

Çizelge 4.6: Ranavirus (FV3) tespiti için qPCR amplifikasyon protokolü.

Döngü Sayısı	İşlem Basamağı	Süre (saat.dakika.saniye)	Sıcaklık
1 Tekrar	Enzim Aktivasyonu	00.10.00	95 °C
	Denatürasyon	00.00.15	95 °C
50	Bağlanma ve Uzama	00.00.60	60 °C
Tekrar	Verilerin Okunması	-	-
1 Tekrar	Melting	-	-

4.2. Rana tavasensis (Tavas kurbağası)

2017- 2019 yılları arasında Ege bölgesinde yapılan arazi çalışmalarda, endemik tür Tavas kurbağası iki farklı lokalitede (Çamlaraltı-Tavas, İnceler kasabası) tespit edilmiş, arazi çalışmaları ve müze metaryalı ile toplam 44 Kırmızılı kurbağa bireyelerine rastlanmıştır.



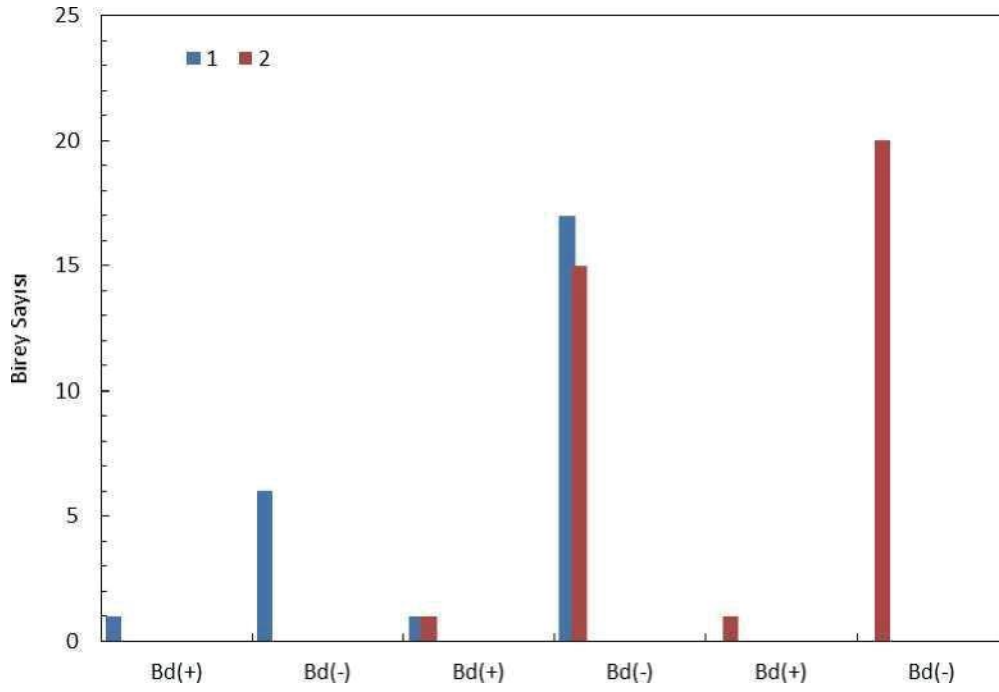
Şekil 4.1: Tavas kurbağası bireyelerinin yakalandığı lokatileteler (U.C.Erişmiş)

2 lokalitenin birinci yılda toplam 7 müze materyalı, ikinci yılında toplam 28 ergin birey, üçüncü yılda 9 ergin birey yakalanmıştır. Üç yılın sonunda toplam 49 bireylerde Real Time PCR yöntemi ile fungal- viral (B. dendrobatidis, FV-3) patojenlerin varlığı/yokluğu araştırılmıştır. Rana tavasensis türünden swaplama ile alınan numunelerden DNA izolasyon işleminden sonra Real Time PCR (RT-PCR) yöntemi ile

B. dendrobatidis patojenin varlığı/yokluğu araştırılmış, buna göre toplam 49 bireyin 3'ünde (%0,6) B. dendrobatidis patojenini taşıdığı tespit edilmiştir. 2019 yılında her iki lokaliteden yakalanan Tavas kurbağalarında fungal patojenin varlığına rastlanmamıştır.

Çizelge 4.7: Lokalitelere göre *Rana tavasensis* türüne ait *B. dendrobatidis* patojenin varlığı, +Bd: pozitif

Lokaliteler	2017	2018	2019	<u>N/(+Bd)</u>	Bd (Prevalans)
1-Tavas (Çamlaraltı	7/1	17/1	4/0	28/2	0.07
2- İnceler	0	15/1	6/0	21/1	0.04
Toplam	7/1	32/2	10/0	49/3	0.06

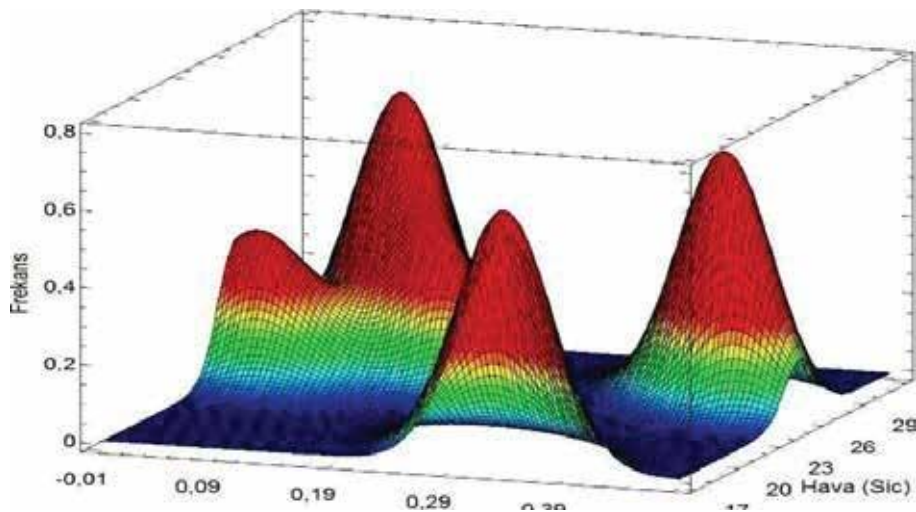


Şekil 4.2: 2017-2018-2019 yıllarına ait *R. tavasensis* populasyonlarında *B. dendrobatidis* patojenin varlık/yokluk dağılım grafiği: 1-Tavas Çamlaraltı, 2-İnceler



Şekil 4.3: R. tavasensis türüne ait örnekleri gösteren lokalite haritası: 1-Tavas Çamlaraltı, 2-İnceler

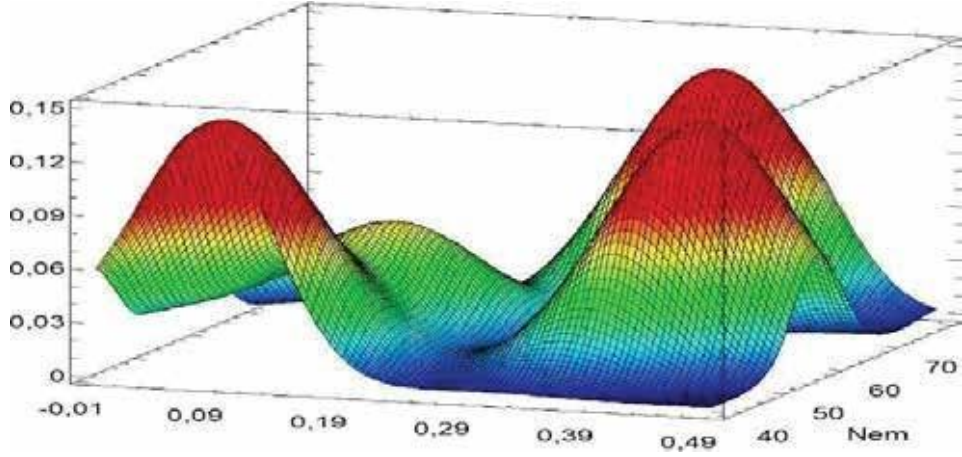
İki popülasyonlarında sırayla toplam yakalanan 28 bireyin 2'sinde (%07) ve 21 bireylerden birinde (%0.4) fungal patojeni tespit edilmiştir. İki popülasyonda ayrı ayrı fungal patojenin taşıma oranı karşılaştırıldığında bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($\chi^2 = 0.22$; $df:1$; $P_{0.06} > 0.05$). Fungal patojenin yaygınlığı hava sıcaklığına bağlı olarak dağılım yapıldığında hava sıcaklığının $24^{\circ}\text{C} - 32^{\circ}\text{C}$ daha fazla olduğu, $15^{\circ}\text{C} - 23^{\circ}\text{C}$ de patojen yaygınlığının daha az olduğu, havadaki nem oranı ile fungal patojenin dağılım analizi ilişkilendiğinde % 42 - %85 arasındaki nem oranında patojen yaygınlığının fazla olduğu suyun pH değeri açısından söz konusu patojen yaygınlığında baz ortamda 7.6 - 9.0 pH da dağılım sık olduğu aşağıda verilen grafikten anlaşılmaktadır.



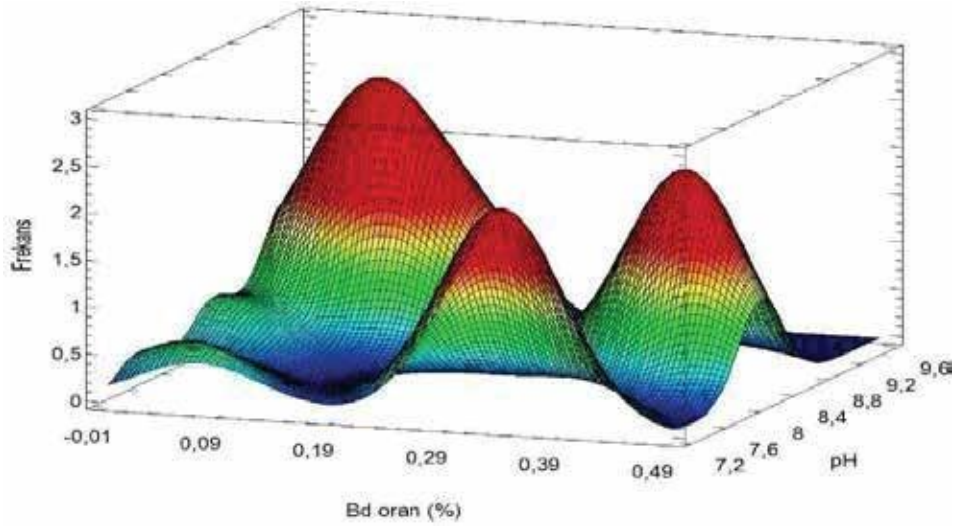
Bd Oran (%)

Şekil 4.4: Rana tavasensis popülasyonlarında B. dendrobatidis patojenin hava sıcaklığına bağlı yaygınlık frekans grafiği

Frekans



Şekil 4.5. Rana tavasensis populasyonlarında B. dendrobatidis patojenin neme bağlı yaygınlık frekans grafiği.



Şekil 4.6: Rana tavasensis populasyonlarında B. dendrobatidis patojenin pH değerine bağlı yaygınlık frekans grafiği.

İki lokaliteden toplanan fungal patojeni taşıyan bireylerin Genomik Equivalans (GE) değeri = $Y = -0.2965X + 11.93$ denkleminde faydalanarak hesaplanmış, lokalitelere

göre GE'e ait ortalama, güven aralığı (CI % 95) ve Ct değerleri çizelge üzerinde verilmiştir.

Çizelge 4.8:Türe ait populasyonlarda genomik equvanat (GE) dağılımı.

Lokalite	N	Ct değeri	GE	Ort (GE)	CI (%95)
Çamlaraltı	2	29.23	679.28	582.24	405.34 - 783.72
		32.56	485.56		
İnciler	1	34.56	392.56	392.56	
Toplam	3			519.13	326.52 - 770.23

Fungal patojenin varlığı veya yokluğu tespit edilen Tavas kurbağasına ait lokalitelerin hava sıcaklığı, nem, yükseklik ve suyun pH değerlerine bağlılık durumunu ortaya koymak için uygulanan Temel Bileşen Analizi (PCA) ile elde edilen varyans (Eigenvalue) ve varyansa katılma değerleri (% of variance) ise çizelgede verilmiştir.

Söz konusu çizelgeden anlaşıldığı üzere Temel Bileşen Analizi, ilk iki eksenin varyansı 1'den büyük olup, varyansa katılma oranları %4'den büyüktür olduğunu, Eksen1 (PCA1) varyansın %59.25' sini, Eksen2 (PCA2) ise varyansın % 30.46' nü ilk iki eksenin toplamı varyansın % 86.17' ni karşıladığı anlaşılmaktadır.

Eksen 1'de analiz edilen parametrelerden hava sıcaklığı, nem oranı ve suyun pH' sı yüksek pozitif korelasyon, yükselti ile ise yüksek zayıf pozitif korelasyon göstermektedir. Eksen 2 ile ise yükselti ile pozitif, hava sıcaklığı, nem oranı ve suyun pH' sı ile yüksek negatif bir korelasyon göstermiştir.

Çizelge 4.9: PCA analizi sonucu ekolojik parametrelere eigenvalue, varyans ve kümülatif varyans değerler

Eksen	Eigenvalue	Varyans (%)	Kümülatif varyans (%)
PCA 1	3,47	69,54	59,25
PCA 2	2,75	30,46	86,17

Çizelgede Temel Bileşen Analizi sonucunda Eksen1 (PCA1) varyansın % 66.23' sini, Eksen2 (PCA2) ise varyansın % 19.14' nü ilk iki eksenin toplamı varyansın % 84.89' sini karşıladığı, elde edilen bu iki eksenindeki lokalitelerin hava sıcaklığı, nem oranı,

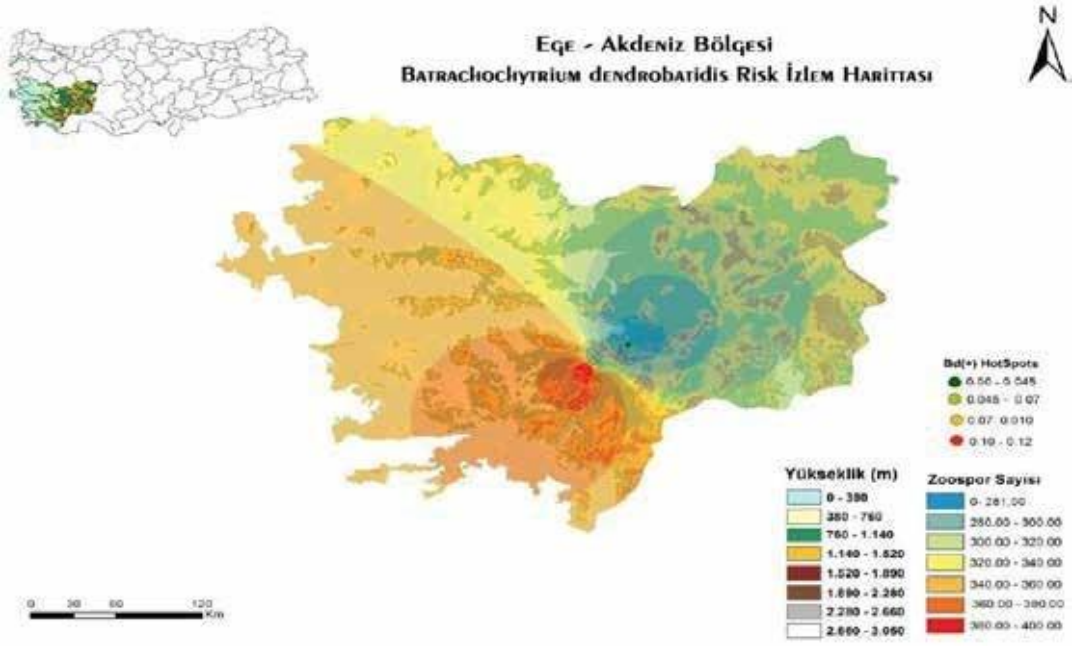
tavas kurbağasında fungal patojenin GE değerleri arasında yüksek pozitif korelasyon (Pearson ve Kendall) katsayı (r) değerlere sahip olacağı belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. Eksenler ile ekolojik parametreler (değişkenler) arasındaki korelasyon (Pearson ve Kendall) katsayısı (r) değerleri (N=29)

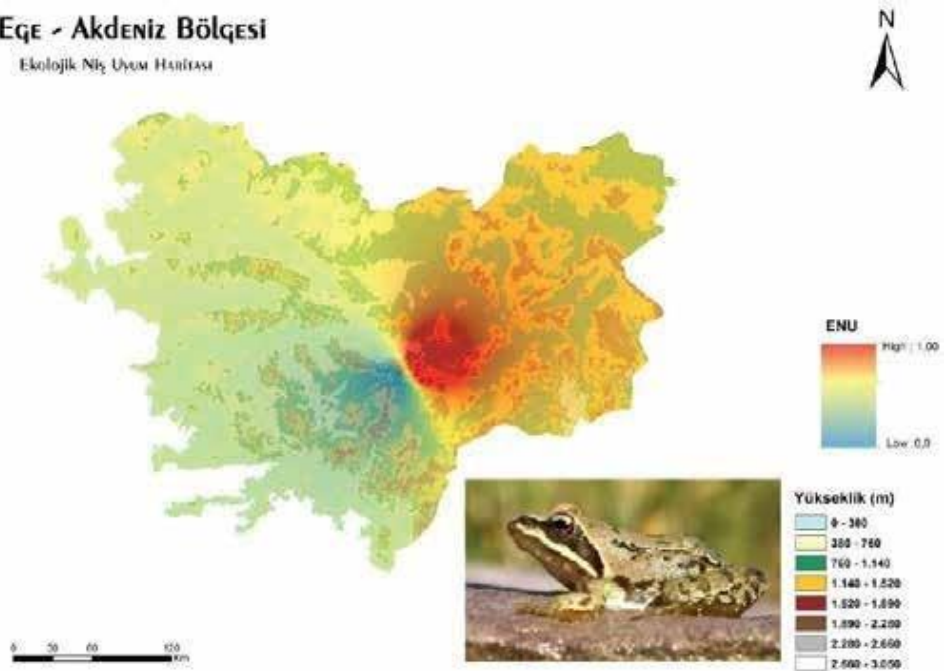
Değişken Kodları	Değişkenler	Eksenler	
		PCA1	PCA2
H	Hava	0.9293	-0.1564
N	Nem	0.8489	-0.0415
PH	Su ph	0.9299	-0.0220
ALT	Yükselti	0.2056	0.9779

Geoistatistik yöntemlerinden biri olan Bayesian enterpolasyon yöntemi; bilinen noktalardan alınan verileri kullanarak, diğer noktalardaki verilerin optimum değerlerini kestiren bir enterpolasyon metod olup, haritalar yardımıyla Ege Bölgesi (Denizli ve çevresi) koşulları dikkate alınarak, Yaygınlık, Zoospor sayısı (GE), Ekolojik Niş Uyum (ENU) haritası elde edilmiştir.

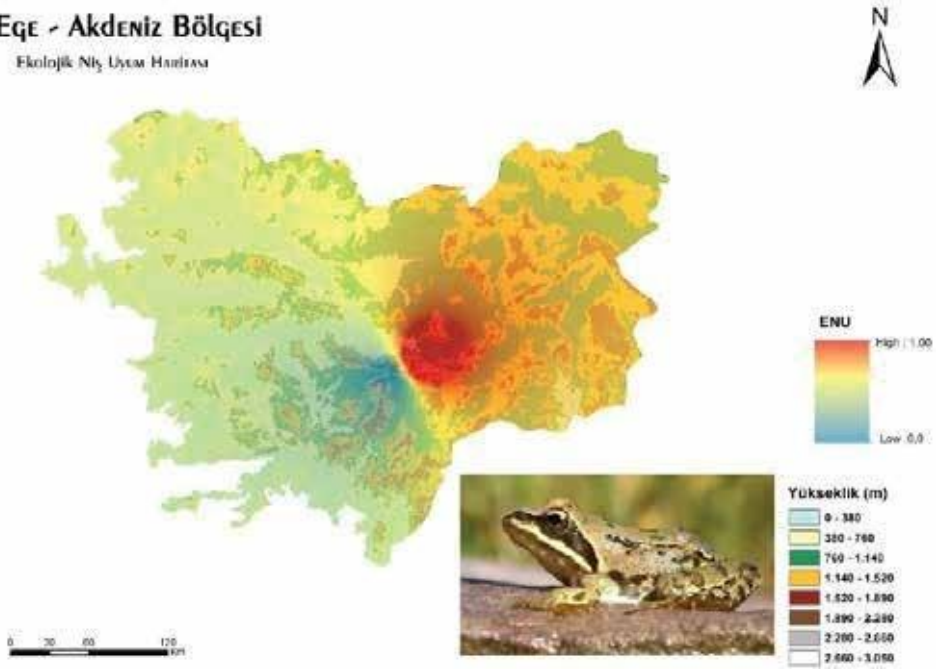
Söz konusu yaygınlığı izlem haritasında Tavas Çamlaraltı enfeksiyonun bulaşma riskinin yoğun olduğu lokalite olup, ancak ekolojik paparmetrelere bağlı olarak ekolojik niş uyumu İnceler populasyonunda daha uygun olduğu anlaşılmaktadır.



Ege - Akdeniz Bölgesi
Ekolojik Niş Uyum Haritası



Ege - Akdeniz Bölgesi
Ekolojik Niş Uyum Haritası



Şekil 4.7:Türe özgü lokalitelere bağlı Bayesian enterpolasyonu ile Yoğunluk, GE, ENU mekânsal dağılım analiz haritası.

4.3. Ranavirus [Frogvirus (FV-3)]

Üç yıllık arazi çalışması sırasında Rana tivasensis türlerinde Ranavirus patojenin tespiti için MCP ve IE iki farklı gen bölgesi qPCR ile çalışmıştır. Yukarıda söz edilen türlerden ranavirüs izole işlemi ile olası ranavirüs DNA izolatlarının her biri, qPCR işlemleri üç defa tekrarlanarak yanlış, negatif veya hatalı pozitif sonuç verme ihtimalleri minimum düzeye indirgenmiştir. Bu üç tekrarlı çalışmalarda pozitif olarak sonuç veren örnekler Ranavirus pozitif şeklinde bildirilmiştir, qPCR cihazından bilgisayar görüntüleme sistemine aktarılan Ct (cycle treshold) değerleri göz önüne alınarak örneklerin pozitif veya negatif oldukları tespitine varılmıştır. Yapılan RT-PCR analizleri sonucunda Rana tivasensis bireyin 9' ünda MCP primeri ile Ranavirus pozitif olarak belirtilmiştir. Ranavirus IE gen bölgesine ait tespit çalışmalarına ait veriler Çizelge 12' de verilmiştir. Buna en yüksek oran Çamlaraltı düşük değer ise İnceler lokalitesinde olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.11: B. bombina türüne ait populasyonlarda MCP ve IE primerleri göre Ranavirüs patojenin varlığı

Lokaliteler		N /(+MCP)			N /(+IE)			+N/(MCP+IE)
		2017	2018	2019	2017	2018	2019	
Çamlaraltı		7/0	17/3	4/0	7/0	17/3	7/1	28/3
İnceler		0	15/1	6/0	0	15/1	6/0	21/1
Yıllık	Toplam Prevalans	7/0 % .00	32/4 % 12.5	10/0 % 0.0	7/0 % 0.00	32/4 % 12.5	13/1 % 07	48/4
Toplam Prevalans		49/4 % 0.4			49/5 % 10.2			% 14

5. TARTIŞMA

Yaşadığımız çağın önemli çevre ve ekonomik alan sorunları içinde üst sıralarda yer alan iklim değişikliği özellikle bizim coğrafyamızda sağlıktan tarıma hayatın pek çok alanında negatif yönde etkiler oluşturan son derece kompleks bir problemdir. Global ölçekte yaşanan iklim değişiklikleri maalesef bütün canlıları olumsuz şekilde etkisi altına almaktadır. Fakat, meydana gelen değişiklikler dünya üzerinde eşit şiddette seyretmediği gibi bireyden bireye de farklı sonuçlar doğurmaktadır. İklim değişikliği neticesinde canlı sağlığı üzerine etkilerini araştırmak amacıyla yapılan çalışmalardan elde edilen bulgulardan birisi de bir takım bulaşıcı hastalıkların vektörlerinin ve dağılımının değişmesidir. Hastalığın ortaya çıkma olasılığı barındıran bölgelerde sıcaklık artışının görülmesi hastalığın yayılma mevsiminin değişmesi, hastalığa bağlı göçlerin artması ve hastalıkların görülme oranının artmasına sebep olmaktadır.

Ülkemizde ise 30 kurbağa (14 Urodel, 16 Anur) ve 127 (10 kaplumbağa, 62 kertenkele ve 55 yılan) sürüngen türü hayatını devam ettirmektedir. Ülkemizde yaşamlarını devam ettirmekte olan kurbağa türlerinin neredeyse tamamı ve sürüngen türlerinin yaklaşık %67'si Dünya Tabiatı Koruma Birliği (IUCN) kırmızı listesinde yerini almıştır. Bu listeye göre, ülkemizde yaşayan kurbağaların %43'ü düşük öncelikli, %17'si tehlike altına girmeye aday, %17'si tehlike altında, %13'ü hassas ve %7'si kritik olarak tehlike altında kategorisinde yer almaktadır. %3'ü hakkında ise yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ayrıca türlerin %80' inin popülasyonları giderek azalmakta, %17'sinin durağan ve %3'ünün ise bilinmemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünya üzerinde yaşayan anur türlerinde gözlemlenen azalmanın önemli sebepleri olarak Chytridiomycosis hastalığının etkeni *B. dendrobatidis* ve FV3 gösterilmektedir. Türkiye’de bulunan 26 amfibi türü (3 anura ve 11 semender endemik türleri) IUCN Kırmızı Listesi’nde yer almamasına rağmen (İnt. Kyn. 2), Türkiye'nin Doğu Karadeniz bölgesindeki amfibi yokoluşlarının nedenleri hala tam olarak anlaşılamamıştır (Başkale vd., 2013).

Türkiye'nin hızlı amfibi azalışları genellikle açık ve kolayca tespit edilebilir fakat kademeli olarak yaşanan azalışlar uzun vadeli gözlemler yapılmadan anlaşılması ve tespit edilmesi zor düşüştür. (Erismis, 2011; Başkale, 2013). Ron (2005) 'a göre, *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) Anadolu da yayıldığı tahmin edilmiştir, fakat Bd'nin coğrafi dağılımı ve Türkiye’de ki kurbağalara etkisi tam olarak anlaşılamamıştır (Farrer vd., 2011; İnt .Kyn .3). Daha önce, sadece iki çalışma Türkiye'de Bd dağılımı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Buna ek olarak, Levant yeşil kurbağaların varlığını (*Pelophylax bedriagae*) bildirmiştir (Göçmen, 2013). Son zamanlarda Bd’ nin Türkiye Batı Anadolu Göller Bölgesinin güneybatısında bulunan Beyşehir Gölü endemik türü olan *Pelophylax caralitanus*, *Pelophylax ridibundus*, *Hyla orientalis*, *Pseudepidalea variabilis* kurbağalarını enfekte ettiğini bildirmişlerdir (Erismis, 2014).

Çizelge 6.1: Türkiye’deki Bd çalışmalar

Tür	Lokalite	n	Pre	GE	Kaynak
<i>Lyciasalamandra. atifi</i>	Fersin	30	-	-	Göçmen vd.
<i>Lyciasalamandra. antalyana</i>	Hurma	30	-	-	Göçmen vd.
<i>Lyciasalamandra billae</i>	Kale	30	-	-	Göçmen vd.
<i>Lyciasalamandra irfani</i>	Göynük	14	-	-	Göçmen vd.
<i>Lyciasalamandra yehudahi</i>	Tahtalı	9	-	-	Göçmen vd.
<i>Lyciasalamandra yehudahi</i>	Gedelm	10	-	-	Göçmen vd.
<i>Lyciasalamandra arikani</i>	Dağdibi	10	-	-	Göçmen vd.
<i>Lyciasalamandra. l.</i>	Boldağ	30	-	-	Göçmen vd.
<i>Lyciasalamandra l. basoglui</i>	Saklıkent	30	-	-	Göçmen vd.
<i>Lyciasalamandra. l. basoglui</i>	Cevreli	31	-	-	Göçmen vd.
<i>Lyciasalamandra. l. luschani</i>	Karader	30	-	-	Göçmen vd.
<i>Lyciasalamandra. fazilae</i>	Gökbel	30	-	-	Göçmen vd.
<i>Lyciasalamandra.</i>	Marmaris	30	-	-	Göçmen vd.
<i>Pelophylax bedriagae</i>	Göynük	2	0,50	3,5	Göçmen vd.
<i>Pelophylax caralitanus</i>	Gölcük	9	11,1	20,4	Erişmiş
<i>Pelophylax caralitanus</i>	Işıklı	39	20,5	350,	Erişmiş
<i>Pelophylax caralitanus</i>	Egirdir	57	14,0	365,	Erişmiş vd.
<i>Pelophylax caralitanus</i>	Beyşehir	20	32,1	264	Erişmiş
<i>Pseudepidalea variabilis</i>	Cevreli	1	-	-	Göçmen vd.
<i>Pseudepidalea variabilis</i>	Akören	13	23,1	30,6	Erişmiş
<i>Pseudepidalea variabilis</i>	Gölcük	7	14,2	10,8	Erişmiş
<i>Pseudepidalea variabilis</i>	Tınaztepe	7	14,2	30,3	Erişmiş
<i>Pseudepidalea variabilis</i>	Erkmen	9	22,2	30,2	Erişmiş
<i>Hyla orientalis</i>	Akören	6	16,7	20,8	Erişmiş
<i>Hyla orientalis</i>	Gölcük	3	-	-	Erişmiş
<i>Hyla orientalis</i>	Erkmen	1	-	-	Erişmiş
<i>Pelobates syriacus</i>	Akören	1	-	-	Erişmiş
<i>Pelophylax ridibundus</i>	Akören	14	42,9	50,7	Erişmiş
<i>Pelophylax ridibundus</i>	Tınaztepe	11	18,2	40,8	Erişmiş
<i>Pelophylax ridibundus</i>	Erkmen	15	13,3	40,8	Erişmiş
<i>Rana macrocnemis</i>	Tınaztepe	3	-	-	Erişmiş
<i>Triturus karelinii</i>	Gölcük	6	-	-	Erişmiş

Türkiye’de Göçmen (2013) tarafından yapılan bir araştırmada 12 bölgede olmak üzere 330 *Lyciasalamandra* türü, 2 *Pelophylax bedriagae* ve 1 *Pseudepidalea variabilis* ile yapılan Bd tespit çalışmasında *Lyciasalamandra* türlerinde ve *Pseudepidalea variabilis* türünden Bd negatif sonuç verirken, *Pelophylax bedriagae*’nın 2 örneğinden 1 tanesi Bd pozitif olarak belirlenmiştir.

Türkiye’de yapılan başka bir çalışmada ise Göller bölgesi olarak adlandırılan bölge de dahil olmak üzere 26 Ağustos Milli Parkından toplanan *Pelophylax caralitanus*, *Pelobates syriacus*, *Pseudepidalea variabilis*, *Hyla orientalis*, *Triturus karelinii*, *Pelophylax ridibundus* ve *Rana macrocnemis*, toplam 7 türe ait 228 amfibi örneğinden Bd tespiti yapılmıştır. 26 Ağustos Milli Parkından toplanan örneklerde türlere göre %8 ile % 29 oranlarında pozitif veri elde edilmiştir. Göller bölgesi çalışmalarında ise Beyşehir gölü %32 pozitiflik ile en yüksek infeksiyon oranına sahip olduğu belirlenmiştir (Erismis, 2014).

Sonuç olarak elde edilen veriler Türkiye üzerindeki tür azalışlarında ve yok olmalarda patojenlerin etkisinin olup olmadığının araştırılmasını zorunlu hale getirmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Ahne, W., Bearzotti, M., Bremont, M. and Essbauer, S. (1998). *Comparison of European systemic piscine and amphibian iridoviruses with epizootic haematopoietic necrosis virus and frog virus 3. Zentralbl Veterinarmed B, 45: 373-383.*
- Ahne, W., Bremont, M., Hedrick, R.P., Hyatt, A.D. and Whittington, R.J. (1997). Special topic review: *Iridoviruses associated with epizootic haematopoietic necrosis (EHNV) in aquaculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 13: 367-373.*
- Ahne, W., Ogawa, M. and Schlotfeldt, H.J. (1990). *Fish viruses: transmission and pathogenicity of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus isolated from sheatfish (Silurus glanis). Zentralbl Veterinarmed B, 37: 187-190.*
- Ahne, W., Schlotfeldt, H.J. and Thomsen, I. (1989). Fish viruses: isolation of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish (Silurus glanis). *Journal of Veterinary Medicine Series B, 36: 333–336.*
- Allender, M.C., Fry, M.M., Irizarry, A.R., Craig, L., Johnson, A.J. and Jones, M. (2006). Intracytoplasmic inclusions in circulating leukocytes from an eastern box turtle (*Terrapene carolina carolina*) with iridoviral infection. *Journal of Wildlife Diseases, 42: 677-684.*
- Annis, S.L., Dastoor, F.P., Ziel, H., Daszak, P., Joyce, E. and Longcore J.E., (2004). A DNA-Based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases, 40(3): 420–428.*
- Anonymous. (2006) *Council directive 2006/88/EC of 24 October 2006 on animal health requirements for aquaculture animals and products thereof, and on the prevention and control of certain diseases in aquatic animals. Official Journal of the European Union L, 328: 14-56.*

- Arikan, H. (1988). On a new form *Rana ridibunda* (Anura: Ranidae) from Turkey. *Istanbul Universitesi Fen Fakültesi Mecmuası*, 53: 81-87.
- Ariel, E. and Bang Jensen, B. (2009). Challenge studies of European stocks of redfinperch, *Perca fluviatilis* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with epizootic haematopoietic necrosis virus. *Journal Fish Diseases*, 32: 1017-1025.
- Ariel, E. and Owens, L. (1997). Epizootic mortalities in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29: 1-6.
- Atatür, M.K., Arikan, H., Mermer, A. (1993). A Preliminary study on the feeding biology of a *Rana ridibunda* (Anura, Ranidae) population from Beyşehir Lake. *Turkish Journal Zoology*, 17: 127-131.
- Bailey, A., Feist, S. (2011). Transmission of ranavirus in the common frog *Rana temporaria* by indirect cohabitation In abstracts of the 15th EAAP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. 12-16th September 2011, Split, p 349.
- Bailey, A.E. (2007). Stability of infectivity of systemic iridoviruses during storage at +4°C and -70°C. In the abstracts of the 7th International symposium on viruses of lower vertebrates. 22-25th April 2007, Oslo.
- Balseiro, A., Dalton, K.P., Del Cerro, A., Marquez, I., Cunningham, A.A., Parra, F., Prieto, J.M., Casais, R. (2009). *Pathology, isolation and molecular characterisation of a ranavirus from the common midwife toad *Alytes obstetricans* on the Iberian Peninsula. Diseases of Aquatic Organisms*, 84: 95-104.
- Balseiro, A., Dalton, K.P., del Cerro, A., Marquez, I., Parra, F., Prieto, J.M., Casais, R. (2009). *Outbreak of common midwife toad virus in alpine newts (*Mesotriton alpestris cyreni*) and common midwife toads (*Alytes obstetricans*) in northern Spain: a comparative pathological study of an emerging ranavirus. Veterinary Journal*, 186: 256-258.

- Bang Jensen, B., Holopainen, R., Tapiovaara, H., Ariel, E. (2011). Susceptibility of pike-perch *Sander lucioperca* to a panel of ranavirus isolates. *Aquaculture*, 313: 24-30.
- Bang Jensen, B., Ersboll, A.K., Ariel, E. (2009). Susceptibility of pike *Esox lucius* to a panel of Ranavirus isolates. *Diseases of Aquatic Organisms*, 83: 169-179.
- Barr, D.J.S. (1990). Phylum chytridiomycota. In *Handbook of Protoctista* (eds L. Margulis, J. O. Corliss, M. Melkman & D. J. Chapman), pp. 454–466. Boston, MA: Jones & Bartlett.
- Bauer, S., Kirschning, C.J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., Lipford, G.B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings National Academy of Science USA*, 98: 9237-9242.
- Berger, L., Hyatt, A.D., Speare, R. and Longcore, J.E. (2005). *Life cycle stages of the amphibian chytrid Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68: 51–63.
- Berger, L.R. Speare, H., Hines, B., Marantelli, G., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Skerratt, L.F., Olsen, V., Clarke, J.M., Gillespie, G., Mahony, M., Sheppard, N., Williams, C., Tyler, M.J. (2004). *Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to Chytridiomycosis*. *Australian Veterinary Journal*, 82 (7): 434–439.
- Berger L. Diseases in Australian Frogs [PhD thesis]. Townsville, Australia. James Cook University: Townsville. (2001).
- Berger, L., Speare, R., Hyatt, A.D. (1999). Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. In: *Campbell A (ed) Declines and disappearances of Australian frogs*. *Environment Australia, Canberra*, p 23–33.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocombe, R., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lips, K.R., Marantelli, G., Parkes, H. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian

- mortality associated with population declines in the rainforests of Australia and Central America. *Proceedings Natural Academy Science USA*, 95: 9031–9036.
- Bollinger, T.K., Mao, J., Schock, D., Brigham, R.M., Chinchar, V.G. (1999). Pathology, isolation, and preliminary molecular characterization of a novel iridovirus from tiger salamanders in Saskatchewan. *Journal of Wildl Disases*, 35: 413-429.
- Bosch, J., Carrascal, L.M., Durán, L., Walker, S. and Fisher, M.C. (2007). Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of Central Spain. *Proceedings of the Royal Society*, 274: 253–260.
- Bosch, J., Martínez-Solano, I. (2006). Chytrid fungus infection related to unusual mortalities of *Salamandra salamandra* and *Bufo bufo* in the Peñalara Natural Park, Spain. *Oryx*, 40(1): 84 – 89.
- Bosch, J., Martínez-Solano, I., García-París, M. (2001). Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation*, 97: 331–337.
- Bovero, S., Sotgiu, G., Angelini, C., Doglio, S., Gazzaniga, E., Cunningham, A.A., Garner, T.W.J. (2008). Detection of chytridiomycosis caused by *Batrachochytrium dendrobatidis* in the endangered Sardinian newt *Euproctus platycephalus* in southern Sardinia, *Italian Journal Wildlife Diseases*, 44(3): 712 – 715.
- Bovo, G., Comuzi, M., DeMas, S., Ceschia, G., Giorgetti, G., Giacometti, P., Cappellozza, E. (1993). Isolamento di un agente virale irido-like da pesce gatto (*Ictalurus melas*) d'allevamento. *Boll Soc Ital Patol Ittica*, 11: 3-10.
- Boyle, D.G., Boyle, D.B., Olsen, V., Morgan, J.A.T., Hyatt, A.D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using Real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60: 141–148.

- Braunwald, J., Tripier, F., Kirn, A. (1979). Comparison of the properties of enveloped and naked frog virus 3 (FV3) particles. *Journal of Genetic Virology*, 45: 673-82.
- Brodman, R., Briggler, T. J. (2008). *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Ambystoma jeffersonianum* larvae in southern Indiana. *Herpetological Review*, 39(3): 320–321.
- Brunner, J.L., Schock, D.M., Collins, J.P. (2007). Transmission dynamics of the amphibian ranavirus *Ambystoma tigrinum* virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 77: 87-95.
- Brunner, J.L., Richards, K., Collins, J.P. (2005). Dose and host characteristics influence virulence of ranavirus infections. *Oecologia*, 144: 399-406.
- Budak, A., Göçmen, B. (2008). Herpetoloji ders kitabı Ege üniversitesi yayınları-fen fakültesi yayın no:194 Isbn 975-483-658-2.
- Chen, Z.X., Zheng, J.C., Jiang, Y.L. (1999). A new iridovirus isolated from soft-shelled turtle. *Virus Research*, 63: 147-151.
- Chinchar, V.G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Williams, T. (2009). Family Iridoviridae: poor viral relations no longer. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 328: 123-170.
- Chinchar, V.G., Essbauer, S., He, J.G., Hyatt, A.D., Miyaki, T., Seligy, V., Williams, T. (2005). Family Iridoviridae. In: Fauguet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) *Virus taxonomy. Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, p145-162.
- Chinchar, V.G., Bryan, L., Wang, J., Long, S., Chinchar, G.D. (2003). Induction of apoptosis in frog virus 3-infected cells. *Virology*, 306: 303-312.
- Chinchar, V.G. (2002). Ranaviruses (family Iridoviridae): emerging cold-blooded killers. *Archives of Virology*, 147: 447-470.
- Chua, F.H.C., Ng, M.L., Ng, K.L., Loo, J.J., Wee, J.Y. (1994). Investigation of outbreaks of a novel disease, 'sleepy grouper disease', affecting the brown-

- spotted grouper, *Epinephelus tauvina* Forskal. *Journal of Fish Diseases*, 17: 417-437.
- Cullen, B.R. (2007). Immunology. Outwitted by viral RNAs. *Science*, 317: 329-330.
- Cullen, B.R., Owens, L. (2002). Experimental challenge and clinical cases of Bohle iridovirus (BIV) in native Australian anurans. *Diseases of Aquatic Organisms*, 49: 83-92.
- Cunningham, A.A., Garner, T.W.J., Aguilar-Sanchez, V., Banks, B., Foster, J., Sainsbury, A.W., Perkins, M., Walker, S.F., Hyatt, A.D., Fisher, M.C. (2005). Emergence of amphibian chytridiomycosis in Britain. *Veterinary Record*, 157: 386-387.
- Cunningham, A.A., Langton, T.E., Bennett, P.M., Lewin, J.F., Drury, S.E., Gough, R.E., Macgregor, S.K. (1996). Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 351: 1539-1557.
- Daszak, P., Cunningham A.A., Hyatt, A.D. (2003). Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, 9: 141–150.
- Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife threats to biodiversity and human health. *Science*, 287: 443–449.
- Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., Green, G.E., Speare, R. (1999). Emerging infectious diseases and amphibian population decline. *Emerging Infectious Diseases*, 5: 735–748.
- De Voe, R., Geissler, K., Elmore, S., Rotstein, D., Lewbart, G., Guy, J. (2004). Ranavirus-associated morbidity and mortality in a group of captive eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). *Journal Zoo Wildlife Medicine*, 35: 534- 543.

- Di Rosa, I., F. Simoncelli, A. Fagotti and R. Pascolini. 2007. The proximate cause of frog Declines. *Nature*, 447: 7144.
- Drury, S.E., Gough, R.E., Cunningham, A.A. (1995). Isolation of an iridovirus-like agent from common frogs (*Rana temporaria*). *Veterinary Record*, 137: 72-73.
- Duffus, A.L., Pauli, B.D., Wozney, K., Brunetti, C.R., Berrill, M.. (2008). Frog virus 3-like infections in aquatic amphibian communities. *Wildlife Diseases Association*, 44: 109-120.
- Eaton, H.E., Metcalf, J., Penny, E., Tcherepanov, V., Upton, C., Brunetti, C.R. (2007). Comparative genomic analysis of the family Iridoviridae: re-annotating and defining the core set of iridovirus genes. *Virology Journal*, 4: 11.
- Erismis U., Konuk M., Yoldas T., Agyar P., Yumuk D., Korcan E. (2014): Survey of Turkey's endemic frogs for amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 111(2):153-7.
- Essbauer, S., Ahne, W. (2002). The epizootic haematopoietic necrosis virus (Iridoviridae) induces apoptosis in vitro. *Journal Veterinary Medicine B Infection Disease Veterinary Public Health*, 49: 25-30.
- Ezer, Beyşehir gölü yüzey su toplama havzası yönetim planı örneğinde ekolojik yaklaşımı, 2003/1.
- Federici, S., Clemenzi, S., Favelli, M., Tessa, G., Andreone, F., Casiraghi, M., Crottini, A. (2008). Identification of the pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian populations of a plain area in the Northwest of Italy. *Herpetology Notes*, 1: 33- 37.
- Fijan, N., Matašin, Z., Petrinc, Z., Valpotic, I., Zwillingberg, L.O. (1991). Isolation of an iridovirus-like agent from green frog (*Rana esculenta* L.). *Veterinarski Arhiv*, 61:151-158.
- Fisher, M.C., Bosch, J., Yin, Z., Stead, D.A., Walker, J., Selway, L., Brown, A.J.P., Walker, L.A., Gow, N.A.R., Stajich, J.E., Garner, T.W.J. (2009). Proteomic and

phenotypic profiling of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* shows that genotype is linked to virulence. *Molecular Ecology*, 18: 415-429.

Fisher M.C., Garner, T.W.J. (2007). The relationship between the introduction of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biology Reviews*, 21: 2–9.

Fox, S.F., Greer, A.L., Torres-Cervantes, R., Collins, J.P. (2006). First case of ranavirus-associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 72: 87-92.

Galli, L., Pereira, A., Márquez, A., Mazzoni, R. (2006). Ranavirus detection by PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) from South America. *Aquaculture*, 257: 78–82.

Gantress, J., Maniero, G.D., Cohen, N., Robert, J. (2003). Development and characterization of a model system to study amphibian immune responses to iridoviruses. *Virology*, 311: 254-262.

Garner, T.W.J., Perkins, M.W., Govindarajulu, P., Seglie, D., Walker, S., Cunningham A.A., Fisher, M.C. (2006). The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology Letters*, 2: 455 – 459.

Garner, T. W. J., Walker, S., Bosch, J., Hyatt, A. D., Cunningham, A. A., Fisher, M. C. (2005). Chytrid fungus in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 11: 1639-1641.

Gibson-Kueh, S., Netto, P., Ngoh-Lim, G.H., Chang, S.F., Ho, L.L., Qin, Q.W., Chua, F.H., Ng, M.L., Ferguson, H.W. (2003). The pathology of systemic iridoviral disease in fish. *Journal of Comparative Pathology*, 129: 111-119.

Gobbo, F., Cappellozza, E., Pastore, M.R., Bovo, G. (2010). Susceptibility of black bullhead *Ameiurus melas* to a panel of ranavirus isolates. *Diseases of Aquatic Organisms*, 90: 167-174.

- Goka, K., Yokoyama, J., Une, Y., Kuroki, T., Suzuki, K., Nakahara, M., Kobayashi, A., Inaba, S., Mizutani, T., Hyatt, A.D. (2009). Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology*, 18(23): 4757–74.
- Goorha, R., Granoff, A., Willis, D.B., Murti, K.G. (1984). The role of DNA methylation in virüs replication: inhibition of frog virus 3 replication by 5-azacytidine. *Virology*, 138: 94-102.
- Goorha, R. (1982). Frog virus 3 DNA replication occurs in two stages. *Journal of Virology*, 43: 519-528.
- Goorha, R., Murti, G., Granoff, A. and Tirey, R. (1978). *Virology*, 84: 32-51.
- Goorha, R., Granoff, A. (1974). Macromolecular synthesis in cells infected by frog virus 3. I. Virus-specific protein synthesis and its regulation. *Virology*, 60: 237- 250.
- Göçmen B., Veith M., Iğci N., Akman B., Godmann O., Wagner N. (2013). No Detection Of The Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* In Terrestrial Turkish Salamanders (*Lyciasalamandra*) Despite Its Occurrence In Syntopic Frogs (*Pelophylax bedriagae*). *Salamandra*, 49(1): 51-55
- Güner, A., Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler), ANG Vakfı/Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları, 2012.
- Granoff, A., Came, P.E., Breeze, D.C. (1966). Viruses and renal carcinoma of *Rana pipiens*. I. The isolation and properties of virus from normal and tumor tissue. *Virology*, 29: 133-148.
- Green D.E., Converse, K.A.A. Schrader, K. (2002). Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996–2001. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 969: 323–339.

- Greer, A.L, Berrill, M., Wilson, P.J. (2005). Five amphibian mortality events associated with ranavirus infection in south central Ontario, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms*, 67: 9-14.
- He, J.G., Lu, L., Deng, M., He, H.H., Weng, S.P., Wang, X.H., Zhou, S.Y., Long, Q.X., Wang, X.Z., Chan, S.M. (2002). Sequence analysis of the complete genome of an iridovirus isolated from the tiger frog. *Virology*, 292:185-197.
- Hedrick, R.P., McDowell, T.S. (1995). Properties of iridoviruses from ornamental fish. *Veterinary Research*, 26: 423-427.
- Holopainen, M. and Toivonen, M. (2012). Weak Signals – Ansoff Today. *Futures*, 44: 198–205.
- Huang, Y., Huang, X., Liu, H., Gong, J., Ouyang, Z., Cui, H., Cao, J., Zhao, Y., Wang, X., Jiang, Y., Qin, Q. (2009). Complete sequence determination of a novel reptile iridovirus isolated from soft-shelled turtle and evolutionary analysis of Iridoviridae. *BMC Genomics*, 10: 224.
- Hyatt, A. D., Boyle, D. G., Olsen, V., Boyle, D. B., Berger, L., Obendorf, D., Dalton, A., Kriger, K., Hero, M., Hines, H., Phillott, R., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F., Colling, A. (2007). Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases Of Aquatic Organisms*, 73: 175–192.
- Hyatt, A.D., Williamson, M., Coupar, B.E., Middleton, D., Hengstberger, S.G., Gould, A.R., Selleck, P., Wise, T.G., Kattenbelt, J., Cunningham, A.A., Lee, J. (2002). First identification of a ranavirus from green pythons (*Chondropython viridis*). *Journal of Wildlife Disases*, 38: 239-252.
- Hyatt, A.D., Gould, A.R., Zupanovic, Z, Cunningham, A.A., Hengstberger, S., Whittington, R.J., Kattenbelt, J., Coupar, B.E. (2000). Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Archives of Virology*, 145: 301-331.
- Jancovich, J.K., Chinchar, V.G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Zhang, Q.Y. (2011). Family Iridoviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz E (eds) *Virus*

- Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
Elsevier Academic Press, p193-210.
- Jancovich, J.K., Bremont, M., Touchman, J.W., Jacobs, B.L. (2010). Evidence for multiple recent host species shifts among the Ranaviruses (family Iridoviridae) *Journal of Virology*, 84: 2636-2647.
- Jancovich, J.K., Mao, J., Chinchar, V.G., Wyatt, C., Case, S.T., Kumar, S., Valente, G., Subramanian, S., Davidson, E.W., Collins, J.P., Jacobs, B.L. (2003). Genomic sequence of a ranavirus (family Iridoviridae) associated with salamander mortalities in North America. *Virology*, 316: 90-103.
- Johnson, A.J., Pessier, A.P., Jacobson, E.R. (2007). Experimental transmission and induction of ranaviral disease in Western Ornate box turtles (*Terrapene ornata ornata*) and reared sliders (*Trachemys scripta elegans*). *Veterinary Pathology*, 44: 285-297.
- Johnson, A.J., Pessier, A.P., Wellehan, J.F., Childress, A., Norton, T.M., Stedman, N.L., Bloom, D.C, Belzer, W., Titus, V.R., Wagner, R., Brooks, J.W., Spratt, J., Jacobson, E.R. (2008). Ranavirus infection of free-ranging and captive box turtles and tortoises in the United States. *Journal of Wildlife Diseases*, 44: 851- 863.
- Karling, J.S. (1977). *Chytridiomycetorum Iconographia: An Illustrated and Brief Descriptive Guide to the Chytridomycetous Genera with a Supplement of the Hyphochytriomycetes* (Lubrecht and Cramer, Monticello, NY).
- Kashi, Y., King, D.G. (2006). Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends in Genetics*, 22: 253-259.
- Kaur, K., Rohozinski, J., Goorha, R. (1995). Identification and characterization of the frog virus 3 DNA methyltransferase gene. *Journal of General Virology*, 76 (8): 1937-1943.
- Kruger, K.M. and Hero, J.M. (2009). Chytridiomycosis, Amphibian Extinctions, and Lessons for the Prevention of Future Panzootics. *Ecohealth*, 6(1): 6-10.

- Kruger, K.M., Hero, J.M. (2007). The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is nonrandomly distributed across amphibian breeding habitats. *Diversity and Distributions*, 13: 781–788.
- Kruger, K.M., Hero, J.M., Ashton K.J. (2006). Cost Efficiency In The Detection Of Chytridiomycosis Using PCR Assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 71: 149–154.
- Lai, Y.S., Murali, S., Ju, H.Y., Wu, M.F., Guo, I.C., Chen, C., Fang, K., Chang, C.Y. (2000). Two iridovirus-susceptible cell lines established from kidney and liver of grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), and partial characterization of grouper iridovirus. *Journal of Fish Diseases*, 23: 379-388.
- Langdon, J.S. (1989). Experimental transmission and pathogenicity of epizootic hematopoietic necrosis (EHNV) in redbfin perch, *Perca fluviatilis* and other 11 species of teleosts. *Journal of Fish Diseases*, 12: 295-310.
- Langdon, J.S, Humphrey, J.D., Williams, L.M. (1988). Outbreaks of an EHNV-like iridovirus in cultured rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Australia. *Journal of Fish Diseases*, 11: 93-96.
- Langdon, J.S., Humphrey, J.D., Williams, L.M., Hyatt, A.D., Westbury, H.A. (1986). First virus isolation from Australian fish: An iridovirus-like pathogen from redbfin perch, *Perca fluviatilis* L. *Journal of Fish Diseases*, 9: 263-268.
- Laurance, W.F., McDonald, K.R., Speare, R. (1996). Australian rain forest frogs: support for the epidemic disease hypothesis. *Conservation Biology*, 10: 406– 413.
- Laurance, WF. (2008). Global warming and amphibian extinctions in eastern Australia. *Austral Ecology*, 33: 1-9.
- Lips, K.R., Diffendorfer, J., Mendelson III, J.R., Sears, M.W. (2008). Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biology*, 6 (3): 441–454.

- Lips, K.R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J.D., R.A., Alford, Voyles, J., Carey, C., Livo, L., Pessier, A.P., Collins, J.P. (2006). Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 103: 3165–3170.
- Longcore, J.E., Pessier, A.P., Nichols, D.K. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91: 219–227.
- Maniero, G.D., Morales, H., Gantress, J., Robert, J. (2006). Generation of a long-lasting, protective, and neutralizing antibody response to the ranavirus FV3 by the frog *Xenopus*. *Development Comparative Immunology*, 30: 649-657.
- Mao, J., Green, D.E., Fellers, G., Chinchar, V.G. (1999). Molecular characterization of iridoviruses isolated from sympatric amphibians and fish. *Virus Research*, 63: 45-52.
- Mao, J., Hedrick, R.P., Chinchar, V.G. (1997). Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. *Virology*, 229: 212-220.
- Mao, J., Tham, T.N., Gentry, G.A., Aubertin, A., Chinchar, V.G. (1996). Cloning, sequence analysis, and expression of the major capsid protein of the iridovirus frog virus 3. *Virology*, 216: 431-436.
- Marantelli, G., Berger, L., Speare, R., Keegan, L. (2004). Changes in distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin during tadpole development leading to high mortality after metamorphosis. *Pacific Conservation Biology*, 10: 173–179.
- Marschang, R.E., Braun, S., Becher, P. (2005). Isolation of a ranavirus from a gecko (*Uroplatus fimbriatus*). *Journal of Zoo Wildlife Medicine*, 36: 295-300.
- Marschang, R.E., Becher, P., Posthaus, H., Wild, P., Thiel, H.J., Muller-Doblies, U., Kalet, E.F., Bacciarini, L.N. (1999). Isolation and characterization of an iridovirus from Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). *Archieve of Virology*, 144: 1909-1922.

- Marsh, I.B., Whittington, R.J., O'Rourke, B., Hyatt, A.D., Chisholm, O. (2002). Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. *Molecular and Cellular Probes*, 16: 137-151.
- McDonald, K.R., Mendez, D., Muller, R., Freeman, A.B., Speare R. (2005). Decline in the prevalence of chytridiomycosis in upland frog populations in North Queensland, Australia. *Pacific Conservation Biology*, 11(2): 114–120.
- Moody, N.J.G. and Owens, L. (1994). Experimental demonstration of pathogenicity of a frog virus, bohle iridovirus, for fish species, barramundi *Lates calcefer*. *Disases of Aquatic Organisms*, 18: 95-102.
- Morales, H.D., Abramowitz, L., Gertz, J., Sowa, J., Vogel, A., Robert, J. (2010). Innate immune responses and permissiveness to ranavirus infection of peritoneal leukocytes in the frog *Xenopus laevis*. *Journal of Virology*, 84: 4912-4922.
- Morales, H.D., Robert, J. (2007). Characterization of primary and memory CD8 T-cell responses against ranavirus (FV3) in *Xenopus laevis*. *Journal of Virology*, 81: 2240 2248.
- Morehouse, E.A., James, T.Y., Ganley, A.R.D., Vilgalys, R., Berger, L., Murphy, P.J., Longcore, J.E. (2003). Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Molecular Ecology*, 12 (2): 395–403.
- Morgan, J.A.T., Vredenburg, V.T., Rachowicz, L.J., Knapp, R.A., Stice, M.J., Tunstall, T., Bingham, R.E., Parker, J.M., Longcore, J.E., Moritz, C., Briggs, C.J., Taylor, J.W., (2007). Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (34): 13845–13850.
- Murti, K.G., Chen, M., Goorha, R. (1985). Interaction of frog virus 3 with the cytomatrix. III. Role of microfilaments in virus release. *Virology*, 142: 317-325.

- Muths E, Gallant AL, Campbell EHC, Battaglin WA and others (2006) The Amphibian Research and Monitoring Initiative (ARMI): 5-year report. US Geological Survey Scientific Investigations Report 2006-5224.
- Nair, V., Zavolan, M. (2006). Virus-encoded microRNAs: novel regulators of gene expression. *Trends Microbiology Journal*, 14: 169-175.
- Nichols, D.K., Lamirande, E.W., Pessier, A.P., and Longcore, J.E. (2001). Experimental transmission of cutaneous chytridiomycosis in dendrobatid frogs. *Journal of Wildlife Diseases*, 37: 1-11.
- Ogawa, M., Ahne, W., Fischer-Scherl, T., Hoffmann, R.W., Schlotfeldt, H.J. (1990). Pathomorphological alterations in sheatfish fry *Silurus glanis* experimentally infected with an iridovirus-like agent. *Disases of Aquatic Organisms*, 9: 187- 191.
- OIE. (2011). Diseases listed by the OIE. In: Aquatic Animal Health Code, Chapter 1.3. World Organisation for Animal Health OIE. (2006). Epizootic haematopoietic necrosis. In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. *World Organisation for Animal Health*, p 82-103.
- Ouellet, M., Mikaelian, I., Pauli, B.D., Rodrigue, J., Green, D.M. (2005). Historical evidence of widespread chytrid infection in North American amphibian populations. *Conservation Biology*, 19: 1431–40.
- Paperna, I., Vilenkin, M., de Matos, A.P. (2001). Iridovirus infections in farm-reared tropical ornamental fish. *Disases of Aquatic Organisms*, 48: 17-25.
- Pasmans, F., Blahak, S., Martel, A., Pantchev, N., Zwart, P. (2008). Ranavirus- associated mass mortality in imported red tailed knobby newts (*Tylototriton kweichowensis*): a case report. *Journal of Veterinary*, 176: 257-259.
- Pessier, A.P., Nichols, D.K., Longcore, J.E., Fuller, M.S. (1999). Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11: 194–199.

- Picco, A.M., Karam, A.P., Collins, J.P. (2010). Pathogen host switching in commercial trade with management recommendations. *Ecohealth*, 7: 252-256.
- Piotrowski, J.S., Annis, S.L., Longcore J.E. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, 96: 9–15.
- Plumb, J.A., Grizzle, J.M., Young, H.E., Noyes, A.D., Lamprecht, S. (1996). An iridovirus isolated from wild largemouth bass. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8:265-270.
- Pounds, J.A., M.R. Bustamante, L.A. Coloma, J.A. Consuegra, M.P.L. Fogden, P.N. Foster, E. La Marca, K.L. Masters, A. Merino-Viteri, R. Puschendorf, S.R. Ron, G.A. Sánchez- Azofeifa, C.J. Still, B.E. Young. (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439:161-67.
- Pozet, F., Morand, M., Moussa, A., Torhy, C., de Kinkelin, P. (1992). Isolation and preliminary characterization of a pathogenic icosahedral deoxyribovirus from the catfish *Ictalurus melas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 14: 35-42.
- Rachowicz, L.J., Knapp, R.A., J. Morgan, A.T., Stice, M.J., Vredenburg, V.T., Parker J.M., Briggs, C.J. (2006). Emerging infectious disease as a proximate cause of amphibian mass mortality. *Ecology*, 87: 1671–1683.
- Reading, C.J. (2007). Linking global warming to amphibian declines through its effects on female body condition and survivorship. *Oecologia*, 151: 125–31.
- Reddacliff, L.A., Whittington, R.J. (1996). Pathology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and redbfin perch (*Perca fluviatilis* L). *Journal of Comparative Pathology*, 115: 103-115.
- Richard B. Primack, *Koruma Biyolojisi*, Çev. Ali A. Dönmez ve Emel O. Dönmez, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 2012.

- Robert, J., Morales, H., Buck, W., Cohen, N., Marr, S., Gantress, J. (2005) Adaptive immunity and histopathology in frog virus 3-infected *Xenopus*. *Virology*, 332: 667-675.
- Rohr, J.R., Raffel, T.R., Romansic, J.M., McCallum, H., Hudson, P.J. (2008). Evaluating the links between climate, disease spread, and amphibian declines. *Proceedings National Academy of Science USA*, 105: 17436–17441.
- Rojas, S., Richards, K., Jancovich, J.K., Davidson, E.W. (2005) Influence of temperature on Ranavirus infection in larval salamanders *Ambystoma tigrinum*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 63: 95-100.
- Ron, S.R., (2005) Predicting the Distribution of the Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica*, 37(2): 209–221.
- Ron, S.R., Duellman, W.E., Coloma, L.A. Bustamante, M.R. (2003). Population decline of the Jambato toad *Atelopus ignescens* (Anura: Bufonidae) in the Andes of Ecuador. *Journal of Herpetology*, 37(1): 116–126.
- Rosenblum, E.B., Römler, H., Schöneberg, T., Hoekstra, H.E. (2010). Molecular and functional basis of phenotypic convergence in white lizards at White Sands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5): 2113-2117.
- Scalera, R., M. J. Adams, S. K. Galvan. (2008). Occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian populations in Denmark. *Herpetological Review*, 39 (2): 199 – 200.
- Simoncelli, F., A. Fagotti, R. Dall’Olio, D. Vagnetti, R. Pascolini and I. Di Rosa. 2005. Evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* Infection in Water Frogs of the *Rana esculenta* Complex in Central Italy. *EcoHealth*, 2: 307–312.
- Skerratt, L.F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., Mc McDonald, K.R., Phillott, A.D., Hines, H.B., Kenyon, N. (2007). Spread of Chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth*, 4: 125 – 134.

- Song, W.J., Qin, Q.W., Qiu, J., Huang, C.H., Wang, F., Hew, C.L. (2004). Functional genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: complete sequence determination and proteomic analysis. *Journal of Virology*, 78: 12576-12590.
- Sparrow, F.K. (1960). Aquatic Phycomycetes (The Univ. of Michigan Press, Ann Arbor, MI), pp. 16–18.
- Speare, R., Smith, J.R. (1992). An iridovirus-like agent isolated from the burrowing frog, *Lymnodynastes ornatus* in northern Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 14: 51-57.
- Spitzen- van der Sluijs, A. M. and R. Zollinger. (2010). Literature review on the American bullfrog. Stichting RAVON, Nijmegen, the Netherlands.
- Stagni, G., Dall'Olio, R., Fusini, U., Mazzotti, S., Scoccianti, C., Serra, A. (2004). Declining populations of Apennine yellowbellied toad *Bombina pachypus* in northern Apennines, Italy: is *Batrachochytrium dendrobatidis* the main cause? *Italian Journal of Zoology*, 71 (Suppl. 2): 5-13.
- Tan, W.G., Barkman, T.J., Gregory, C.V., Essani, K. (2004). Comparative genomic analyses of frog virus 3, type species of the genus *Ranavirus* (family Iridoviridae). *Virology*, 323: 70-84.
- Tapiovaara, H., Olesen, N.J., Linden, J., Rimaila Parnanen, E., von Bonsdorff CH (1998). Isolation of an iridovirus from pike-perch *Stizostedion lucioperca*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 32: 185-193.
- Tidona, C.A., Schnitzler, P., Kehm, R., Darai, G (1998). Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution. *Virus Genes*, 16: 59-66.
- Tidona, C.A., Schnitzler, P., Kehm, R., Darai, G. (1996). Identification of the gene encoding the DNA (cytosine-5) methyltransferase of lymphocystis disease virus. *Virus Genes*, 12: 219-229.

- Tsai, C.T., Ting, J.W., Wu, M.H., Wu, M.F., Guo, I.C., Chang, C.Y. (2005). Complete genome sequence of the grouper iridovirus and comparison of genomic organization with those of other iridoviruses. *Journal of Virology*, 79: 2010-2023.
- Une, Y., Sakuma, A., Matsueda, H., Nakai, K., and Murakami, M. (2009). "Ranavirus outbreak in North American Bullfrogs (*Rana catesbeiana*), Japan, 2008. *Emerging Infectious Diseases*, 15(7): 1146-1147.
- Voyles, J., Berger, L., Young, S., Speare, R., Webb, R., Warner, J., Rudd, D., Campbell, R., Skerratt, L.F. (2007). Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with Chytridiomycosis. *Diseases Of Aquatic Organisms*, 77: 113– 118.
- Walker, S. F., Bosch, J., Gomez, V., Garner, T.W.J., Cunningham, A.A., Schmeller, D.S., Ninyerola, M., Henk, D., Ginestet, C., Arthur, C.P. and Fisher, M.C. (2010). Factors driving pathogenicity vs. prevalence of amphibian panzootic chytridiomycosis in Iberia. *Ecology Letters*, 13(3): 372-82.
- Walker, S.F., Bosch, J., James, T.Y., Litvintseva, A.P., Valls, J.A.O., Piña, S., García, G., Abadie Rosa, G., Cunningham, A.A., Hole, S., Griffiths, R. and Fisher, M.C. (2008). Invasive pathogens threaten species recovery programs. *Current Biology*, 18(18): R853 – R854.
- Weldon, C., du Preez, L.H., Hyatt, A.D., Muller, R., Speare, R. (2004). Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases*, 10 (12): 2100–2105.
- Whittington, R.J., Becker, J.A., Dennis, M.M. (2010). Iridovirus infections in finfish critical review with emphasis on ranaviruses. *Journal of Fish Diseases*, 33: 95- 122.
- Whittington, R.J., Reddacliff, G.L. (1995). Influence of environmental temperature on experimental infection of redbfin perch (*Perca fluviatilis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with epizootic haematopoietic necrosis virus, an Australian iridovirus. *Australian Veterinary*, 72: 421-424.

- Whittington, R.J., Philbey, A., Reddacliff, G.L., Macgown, A.R. (1994). Epidemiology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): findings based on virus isolation, antigen capture ELISA and serology. *Journal Of Fish Diseases*, 17: 205-218.
- Williams, T., Barbosa-Solomieu, V., Chinchar, V.G. (2005). A decade of advances in iridovirus research. *Advanced Virus Research*, 65: 173-248.
- Williams, T. (1996). The iridoviruses. *Advanced Virus Research*, 46: 345-412.
- Willis, D.B., Goorha, R., Chinchar, V.G. (1985). Macromolecular synthesis in cells infected by frog virus 3. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 116: 77-106.
- Willis, D.B., Goorha, R., Granoff, A. (1984). DNA methyltransferase induced by frog virus 3. *Journal of Virology*, 49: 86-91.
- Willis, D. B. and Granoff, A. (1980). *Virology*, 107: 250-257.
- Woodland, J.E., Brunner, C.J., Noyes, A.D., Grizzle, J.M. (2002). Experimental oral transmission of largemouth bass virus. *Journal of Fish Diseases*, 25: 669-672.
- Zhang, Q.Y., Xiao, F., Li, Z.Q., Gui, J.F., Mao, J., Chinchar, V.G. (2001). Characterization of an iridovirus from the cultured pig frog *Rana grylio* with lethal syndrome. *Diseases of Aquatic Organisms*, 48: 27-36.
- Zupanovic, Z., Musso, C., Lopez, G., Louriero, C.L., Hyatt, A.D., Hengstberger, S., Robinson, A.J. (1998). Isolation and characterization of iridoviruses from the giant toad *Bufo marinus* in Venezuela. *Diseases of Aquatic Organisms*, 33: 1-9.

İNTERNET KAYNAKLARI

1. globalamphibians.org
2. <http://www.iucnredlist.org/>
3. <http://amphibiaweb.org/declines/diseases.html>
4. <http://www.spatialepidemiology.net/B.dendrobatidis>

