

Viral Hemorajik Septisemi Virusu ve İnfeksiyöz Hematopoetik Nekrozis Virusu'nun Moleküler Epidemiyolojisi*

Selmin Özer

Mersin Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yenişehir Kampüsü, 33169, Mersin, Türkiye
E-mail: selmind@mersin.edu.tr

Abstract: Molecular epidemiology of viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious haematopoetic necrosis virus. Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) and Infectious Haematopoetic Necrosis (IHN) are among viral diseases causing high fish mortality and thus economic losses in aquaculture. The main principles of amplification of G-and NV genes of VHSV and IHNV strains by RT-PCR, sequencing of these G-and NV gene cDNA including the intergenic region and the analysis of the relationship between viral strains are presented in this article.

Key Words: Molecular biology, RT-PCR, Fish Disease, VHS, IHN

Özet: Viral balık hastalıklarından Viral Hemorajik Septisemi (VHS) ve İnfeksiyöz Hematopoetik Nekrozis (IHN) balıklarda yüksek oranda ölümlere yol açarak önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu derlemede, Viral Hemorajik Septisemi Virusu (VHSV) ve İnfeksiyöz Hematopoetik Nekrozis Virusu (IHNV) suşlarının Glukoprotein-ve Nonvirionprotein (G-ve NV) genlerinin Reverse Transkriptaz-Polimerase Zincir Reaksiyon (RT-PCR) yöntemi ile amplifikasyonu, G-ve NV genlerinin genler arasındaki bölgeyi kapsayan komplementer-Desoksiribonukleik asit (cDNA)'in dizi analizi ve bu viral suşlar arasındaki akrabalığın saptanması yöntemlerine ait temel prensipler sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Moleküler Biyoloji, RT-PCR, Balık Hastalıkları, VHS, IHN

*Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, Almanya'da 2001 yılında Dr. Peter-Joachim Enzmann ile 3 aylık kurs süresince çalışılan konuların özeti.

Giriş

Su ürünleri yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen en önemli faktör balık hastalıkları olup, büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu olumsuz sonuçların önüne geçmek amacıyla, Avrupa Birliği (AB) balık sağlığı kontrolü için gerekli yasal düzenlemeleri "AB Balık Sağlığı Rejimi" isim ve "91/67/EEC numaralı" direktifi ile yürürlüğe koymuştur. Bu direktif kapsamında balık çiftliklerinin hastalıklar yönünden periyodik olarak denetlenmesi zorunluluğu getirilmekte, böylece balık hastalıklarından arındırılmış kuşaklar oluşturulması hedeflenmektedir. VHSV ve IHNV de "AB ülkelerindeki işletmelerde görülebilen, ciddi ekonomik kayıplara neden olan, sağaltımı ya da aşısı bulunmayan ve bulunduğu çiftliklerin belirlenmesi gereken hastalıklar" listesinde yer almaktadır (Anonym, 1991). Ülkemizde de IHN hastalığı "ihbarı zorunlu hayvan hastalıkları" arasına alınmıştır (Anonym, 1999).

VHSV ve IHNV Salmonid türü balıklarda, özellikle de yetiştiriciliği yapılan Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) yol açtığı %100'e varan mortaliteye bağlı büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu virusların teşhisi için numune alım kuralları ve muayene metotları AB'nin 2001/183/EEC (Anonym, 2001) sayılı direktifinde yer almaktadır. Ancak bu metotlarla virusların teşhisi çok uzun sürdüğünden, daha hızlı ve güvenilir metotların yürürlüğe konulması zorunlu hale gelmiştir. Bu amaçlarla geliştirilmiş olan bir RT-PCR yöntemi, IHNV ve VHSV'nin ayırıcı tanısında başarı ile kullanılmaktadır.

Bu derlemenin temel amacı, yetiştiriciliği yapılan balıklarda yüksek ölümlerle seyrederek büyük ekonomik kayıplara neden olan viral hastalıkların hızlı ve güvenilir tanısına olanak veren Reverse Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu yönteminin tanıtılmasıdır. DNA dizi analizi (sekans) sonucu virus suşları arasındaki akrabalık düzeylerinin saptanmasına ise hastalık kaynaklarının belirlenmesi ve hastalıklarla mücadeledeki önemi nedeniyle yer verilmiştir.

VHSV ve IHNV'nin Bazı Özellikleri

Her iki virus da Rhabdoviridae familyasında yer almaktadır. VHS viruslarının, 1990 başlarına kadar 3 serotipi ayırt edilmiştir. IHNV'nin serotipi yoktur, ancak farklı kökenleri vardır. Asit, sıcaklık ve etere karşı duyarlı, alkali çözeltilere karşı oldukça dayanıklı olan bu viruslar genel olarak mermi şeklindedirler, ancak küresel, çok şekilli, oldukça uzun, dallanmış ya da basil gibi şekillerde de olabilmektedirler. Elektronmikroskopik bulgular VHSV'nin 180 nm uzun ve 60-70 nm çapında, IHNV'nin de 70-95x160-170 nm boyutlarında olduklarını göstermektedir (Miller, 1998; Plumb, 1999).

VHSV ve IHNV, zarflı ve nükleokapsiti helikal yapıda viruslar olup, iç kısımlarında negatif polariteye sahip tek sarmal Ribonukleik asit (RNA), RNA etrafında Ribonukleinprotein ve dışta Lipoprotein yapısında bir kılıftan oluşmaktadır. Glikoprotein (G), virus kılıfının en dışında yer almakta olup, virüsü nötralize eden antikorlar bu proteine karşı oluşmaktadır. Membranprotein (M2) zarın lipit tabakasının iç

kısımında bulunmaktadır. Nukleoprotein (N) çıplak RNA sarmalının etrafını sarmalamış olarak bulunmakta, viral RNA ile birlikte, Ribonukleoprotein olarak adlandırılan Nukleokapsidi oluşturmaktadır. RNA sarmalının yakınında serbest olarak bulunmakta olan Largoprotein (L), Matriksprotein (M1) (kofaktör) ile birlikte RNA-polimerazı oluşturmaktadır. Non-virionproteinini (NV) muhtemelen yapısal

bir protein oluşturmamakla birlikte, virionda bulunmadığına dair herhangi bir bulgu henüz yoktur (Enzmann, kişisel görüşme, 2001; Miller, 1998). Bu proteinlerin RNA üzerindeki genetik kodlarını da N, M₁, M₂, G, NV ve L genleri oluşturmaktadır (Enzmann, kişisel görüşme, 2001).

IHNV ve VHSV'nin genetik materyalini bir düzlem üzerinde gösterecek olursak:

3' Lea N M1 M2 G NV L Tr 5'

Lea: Leader-başlangıç, yönlendirici nükleotidler;

Tr: Trailer, bitiş gösteren nükleotidler olup gen değildirlir.

VHS ve IHN Viruslarının Tanısı

VHS ve IHN viruslarının tanısı için numune alım kuralları ve muayene metodları Avrupa Birliği'nin 2001/183/EEC (Anonym, 2001) sayılı direktifinde ayrıntılı olarak yer almaktadır. Buna göre dalak, böbreğin ön kısmı ve kalp ya da beyin örnekleri; anaç balıklardan ayrıca ovaryal sıvı da alınarak, hücre kültürlerine ekimler yapılmalıdır. Hücre kültüründe Cytopathic effect (CpE) oluşması durumunda da Nötralizasyon Testi (NT), İmmunofluoresan Antikor Testi (IFAT) ya da Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testlerinden en az biri uygulanmalıdır (Anonym, 2001; Miller, 1998). Ancak direktifte yer alan metotlarla bu virusların teşhisi üç hafta kadar sürmektedir. Bu süre zarfında ise hastalık devam edip yayılacağından, daha hızlı ve güvenilir metotların yürürlüğe konulması zorunlu hale gelmiştir. Değişik VHS ve IHN virus suşlarının sekans verileri incelendiğinde, her iki virus için de G geninin PCR ile ayırıcı teşhis için uygun olduğu anlaşılmış, bu bilgiler doğrultusunda Bruchhof ve diğ. (1995) VHS ve IHN viruslarının ayırıcı tanısı için bir RT-PCR yöntemi geliştirmişlerdir. Miller ve diğ. (1998b) de hasta balıkların organlarından direkt olarak yaptıkları bir araştırma sonucunda RT-PCR yöntemi ile sadece 7-9 saat içinde VHSV/IHNV'yi teşhis ettiklerini bildirmişlerdir. Günümüzde RT-PCR yöntemi, IHNV ve VHSV tanısında başarı ile kullanılmaktadır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction, PCR)

PCR, DNA'nın *in vitro* koşullarda çoğaltılması (*amplifikasyon*) amacıyla kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem 1985 yılında Mulis ve diğ. tarafından geliştirilmiştir (Miller, 1998; Köksal, 2001). PCR, biyoloji, tıp, paleontoloji gibi alanlarda molekülerbiyolojik araştırmalarda kullanılmakta, özellikle mikrobiyolojide birçok mikroorganizmanın direkt tanısında başarı ile uygulanmaktadır (Köksal, 2001).

PCR, çok az miktardaki DNA'nın birkaç saat içinde çoğaltılmasını sağlamaktadır. Hücre içinde (*in vivo*) DNA replikasyonu, çeşitli enzimler tarafından düzenlenen ve genomun kopyalanması ile sonuçlanan bir işlemdir. PCR işleminde ise *in vivo* replikasyon örnek alınarak, DNA'nın istenilen spesifik bölgelerinin kopyalanması gerçekleştirilmektedir. PCR işleminde kullanılan enzim ise, yüksek sıcaklıklara dayanıklı *Thermus aquaticus*

bakterisinden elde edilmiş Taq-DNA-polimeraz enzimidir (Enzmann, kişisel görüşme, 2001; Köksal, 2001; Miller, 1998).

Yaklaşık 30 siklustan oluşan PCR işleminde temel olarak tekrarlayan 3 aşama vardır:

Denatürasyon: Örnekte bulunan çift sarmal-DNA (çsDNA)'nın birkaç saniyede, 92-95°C'de, tek sarmal DNA (tsDNA)'ya ayrılmasıdır. Bazı çalışmalarda 3-5 dakikalık bir ön denatürasyon işleminin zor olan kalıp DNA'lar için yararlı olduğu bildirilmektedir.

Bağlanma (Annealing): Örnek, birkaç dakika 45-65°C'de tutularak sense ya da antisense primer'in (nükleotidlerden oluşan kısa DNA-molekülleri) tsDNA'daki hedef bölgelere bağlanması (*hibridizasyon*) sağlanmaktadır. Bağlanma ısısı, primer yapısı ve erime derecesine göre hesaplanmakta ve yaklaşık 20 bazçifti (bç) uzunluğundaki primerler için 54°C olarak optimize edilmiştir.

Uzama (Extension): Taq-DNA-polimeraz enzimi yardımı ile tsDNA kalıplarına bağlanan primerlerin 5'→3' yönünde ve tsDNA'nın nükleotid dizisinin komplementeri olarak uzatılmasıdır. Bu işlem optimum 72°C'de birkaç dakika sürmektedir. Bu döngü sonunda, mevcut DNA fragmanı yeni komplementer DNA (cDNA) ve yeni kalıp DNA'lar oluşturarak her PCR döngüsü sonunda örnek DNA miktarı iki katına çıkmaktadır. 30 siklus sonunda ise hedef DNA'nın milyardan fazla kopyası elde edilmektedir.

İk döngüde (denatürasyon-bağlanma-uzama) değişik uzunluklarda polimeraz ürünleri varken, 30 döngü sonunda, gen aralığı primer çiftleri tarafından belirlenmiş spesifik gen fragmanları ürünün çoğunu oluşturmaktadır (Enzmann, kişisel görüşme, 2001; Köksal, 2001; Miller, 1998; Temel, 2001) (Şekil 1).

4-5 saat kadar süren PCR işlemi sonrasında elde edilen PCR ürünleri *Agarose Jel Elektroforez* yöntemi ile kontrol edilmektedir (Köksal, 2001; Miller, 1998).

PCR'in Avantajları

-Primer spesifik hedef dizileri kullanılmaktadır.

-PCR'in en önemli avantajı 25 bç'den 10 000 bç'ne kadar olan spesifik DNA dizilerini amplifiye edebilme özelliğine sahip olmasıdır.

-Oldukça hızlı bir yöntemdir. Bir DNA parçası sadece 3 saatte milyon defa kopyalanmaktadır (Köksal, 2001).

PCR'in Dezavantajları

- Yanlış negatif ve pozitif sonuç verme olasılığı vardır. Bu olasılıkları düşürmek için alınabilecek önlemler vardır.
- Pahalı bir yöntemdir (Köksal, 2001).

1. Denatürasyon Aşaması:

5' -AAACGGTTAGCGATGCGATGCACGTAGCATTGAAGCCTTAAGAA- 3'
3' -TTGCCAATCGCTACGCTACGTGCATCGTAAACTTCGGAATTCT T- 5' çsDNA

92-95°C'de Denatürasyon sonucu iki tsDNA oluşur:

5' -AAACGGTTAGCGATGCGATGCACGTAGCATTGAAGCCTTAAGAA- 3'
3' -TTGCCAATCGCTACGCTACGTGCATCGTAAACTTCGGAATTCTT- 5'

2. Bağlanma Aşaması: 54°C'de primerler tsDNA'lara bağlanır:

5' -AAACGGTTAGCGATGCGATGCACGTAGCATTGAAGCCTTAAGAA- 3'
(antisense primer) 3' TCGTAAACTTCGGAATTCTT 5'

5' AAA CGGTTAGCGATGCGATG 3' (sense primer)
3' -TTGCCAATCGCTACGCTACGTGCATCGTAAACTTCGGAATTCTT- 5'

3. Uzama Aşaması: 72°C'de primer öncülüğünde tsDNA'ların komplementleri üretilir:

5' -AAACGGTTAGCGATGCGATGCACGTAGCATTGAAGCCTTAAGAA- 3'
3' **TTGCCAATCGCTACGCTACGTGCATCGTAAACTTCGGAATTCTT** 5'

5' **AAACGGTTAGCGATGCGATG CACGTAGCATT GAAGCCTT AAGAA** 3'
3' -TTGCCAATCGCTACGCTACGTGCAT CGTAAACTTCGGAATTCTT- 5'

Şekil 1. PCR'in temel aşamaları (Enzmann, kişisel görüşme, 2001),
A=Adenin, T=Timin, G=Guanin, C=Citosin, *İtalik harfler*= sense ve antisense Primerler, *Koyu harfler*= Komplementer DNA.

Yöntem

VHSV ve IHNv suşlarının G-ve NV genlerinin RT-PCR Yöntemi ile Amplifikasyonu

RT-PCR yöntemi virüsün hücre kültürlerinde çoğaltılması, izolasyon ve hasatının yapılmasıyla uygulanabildiği gibi (Bruchhof ve diğ., 1995; Miller, 1998; Miller ve diğ., 1998a) hastalıktan şüpheli balığın organlarından (dalak, ön-böbrek, beyin ve kalp) direkt olarak da (Miller ve diğ., 1998a, b) uygulanabilmektedir. Direkt olarak organlardan ya da hasat virus'tan virus RNA'sı ekstrakte edilmekte, elde edilen virus RNA, RT işlemine tabi tutularak cDNA oluşumu sağlanmaktadır. cDNA ise, PCR işlemine tabi tutulmakta ve gen aralığını sense ve antisense primer çiftlerinin oluşturduğu, spesifik büyüklükte, milyonlarca gen fragmanı elde edilmektedir. Bu PCR ürünleri, Agaroz jel üzerine aktararak elektroforez işlemi yapılmaktadır. Agaroz jel tabakasının UV ışığı altında fotoğrafı alınarak RT-PCR sonucu değerlendirilmekte, böylece virüslerin tanısı konulmaktadır (Enzmann, kişisel görüşme, 2001; Miller, 1998).

Virus Hasatı

VHS ve IHN virüslerinin hasatı Avrupa Birliği'nin 2001/183/EEC sayılı kararı uyarınca yapılmaktadır. Hastalıktan kuşku balıklardan alınan organlar uygun hücre kültürlerine metoda uygun olarak ekilmekte, hücrelerde CpE oluşması durumunda virus hasatı yapılmaktadır. Hasat virus, önce IFAT, NT ya da ELISA gibi serolojik testlere tabi tutularak virüsün varlığı teyit edilmekte, titrasyon ve/veya plak testleri ile de hasat virüsün titrasyon oranı saptanmaktadır. İçinde VHSV ya da IHNv olduğu düşünülen bu ürüne *Hasat*

Virüs denilmektedir. Her iki virüsün replikasyon çalışmalarında en çok Rainbow Trout Gonad (RTG-2) ve Epithelioma papulosum Cyprinidae (EPC) hücreleri, bunların yanında Fat Head Minnow (FHM), Chinook Salmon Embryo (CHSE) ve Blue Gill Fry (BF₂) hücreleri de kullanılmaktadır (Anonym, 2001; Enzmann, kişisel görüşme, 2001; Miller, 1998).

RNA Ekstraksiyonu

Gerek organlar gerekse de hasat virüstan, AGS-Metodu'na göre virus-RNA'sı saf olarak elde edilmektedir. Elde edilen bu ürün VHSV ya da IHNv'nin tüm RNA'sıdır (Miller ve diğ., 1998; Enzmann, kişisel görüşme, 2001).

Reverse Transkripsiyon (RT)

PCR, RNA ile çalışmadığından, önce RNA'dan DNA elde edilmelidir. Reverse Transkripsiyon ters kopyalama işlemi olup, (-)tek sarmal virus RNA'sının komplementeri (+)tek sarmal DNA (cDNA) elde edilmektedir. VHS ve IHN virüslerinin identifikasyonunda G-ve NV genleri kullanıldığından, RT işleminde kullanılan primer G geninin başlangıcındaki 20 nükleotidin komplementlerinden oluşmaktadır. Elde edilen cDNA G geni ile başlayıp, virus RNA'sını oluşturan genomun devamını da kapsamaktadır (Enzmann, kişisel görüşme; 2001; Miller, 1998). Bu işlem ile virus RNA'sı AMV-reverse transkriptaz enzimi (tavuklarda lösemi yapan Avian Myeloblastosis Virüsü'nden elde edilmektedir ve 42°C'ye dayanıklıdır) tarafından okunmakta, ortamda bulunan dNTP (desoksi-nükleotid-tri-phosphat)'ların varlığı sayesinde, virus RNA zincirinde bulunan nükleotidlerin komplementleri primerin öncülüğünde yanyana gelecek cDNA oluşturulmaktadır. Bu dönüşüm (*Transkripsiyon*) sıcaklığın etkisinde gerçekleşmektedir (Enzmann, kişisel görüşme, 2001). RT işlemi sonucunda RNA/cDNA heterodubleksi meydana gelmektedir (Köksal, 2001).

cDNA'nın PCR ile Amplifiye Edilmesi

RT işleminin ardından cDNA PCR ile çoğaltılarak PCR ürünleri elde edilmektedir. Bu zincir reaksiyonunu başlatılmak için cDNA yanında, DNA'nın uzamasını sağlamak için DNA'ya spesifik olarak bağlanan primer çiftleri (Tablo 1), dNTP'ler ve Taq-DNA-polimeraz enzimi gereklidir (Miller, 1998). Amplifikasyon için önceden programlanmış Thermocycler'de yapılan PCR işlemi ile (+)tek sarmal cDNA'dan çift sarmal DNA elde edilerek bunun milyonlarca kopyası üretilmektedir. Elde edilen gen fragmanları, G-ve NV genleri aralığında olacak şekilde, farklı sense ve antisense primerlerin sınırlarını çizdiği spesifik büyüklüktedir (Enzmann, kişisel görüşme, 2001; Miller, 1998). IHNv ve VHSV'nin PCR ile identifikasyonunda sadece G geni kullanılabildiği gibi, G-ve NV genleri de temel alınabilmektedir (Enzmann ve diğ., 2000). PCR işleminde, her zaman, Pozitif Kontrol da işleme alınarak PCR işleminin doğru çalışıp çalışmadığı kontrol edilmektedir. Her iki virus için de Pozitif Kontrol olarak VG7 (bir plasmid olup VHS'in G-genini çift sarmal DNA olarak içermektedir) kullanılmaktadır. VG7'nin amplifikasyonunda kullanılan kontrol primerler her iki virus için de aynıdır (Enzmann, kişisel görüşme, 2001; Miller, 1998).

Tablo 1. RT-PCR'de kullanılan primerlerin nukleotid dizi yapısı (Bruchhof ve diğ., 1995).

Primer Adı	Primer Çiftleri Nukleotid Uzunlukları	Primer Nukleotid Dizisi (Sekans)	Pozisyonu	
VG1	s	VG1 - VGR: 1524 bç	5'-ATGGAATGGAACACTTTTTTC-3'	1-21
VGR	a		5'-TCAGACCGTCTGACTTCTGGA-3'	1505 - 1524
IG1	s	IG1 - IGR: 1512 bç	5'-ATGATCACCCTCCGCTCATT-3'	1 - 21
IGR	a		5'-CCGGTTTGCCAGGTGATACAT-3'	1492 - 1512
VD5	s	VD5 - VD3: 440 bç	5'-TCCCCTATCAGTCACCAG-3'	254 - 272
VD3	a		5'-TGATGATCATGGCTCCTGGTG-3'	678 - 697
ID4	s	ID4 - ID3: 548 bç	5'-CTCTGGACAAGCTCCAAGG-3'	134 - 154
ID3	a		5'-GATTGGAGATTTTATCAACA-3'	663 - 682

VG1, VGR, VD3, VD5=VHSV Primerleri, IG1,IGR, ID3, ID4=IHNV Primerleri, s: sense a: antisense bç: baz çifti, A: Adenin T: Timin C: Citosin G: Guanin.

Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez, moleküllerin elektrik yüklerindeki farklara göre geliştirilmiş bir teknik olup, bir elektriksel alanda, moleküllerin kütlesine oranla belirli hızda göç etmeleri prensibine dayanmaktadır. Gen fragmanlarını ayırmada genellikle *Agaroz Jel Elektroforezi* yöntemi kullanılmaktadır (Özerol, 2001).

Yöntemin uygulanmasında, önce Agaroz jel kabı içi elektroforez sıvısı ile dolu Elektroforez kabına yerleştirilmektedir. PCR ürünlerinden belirli miktarlarda alınarak jel üzerinde görünür hale getirmek için Loading Buffer (LB) ile karıştırılmaktadır. Bu PCR ürünleri ve Marker (Nukleotid sayısı bilinen DNA-fragmanları içermektedir) Agaroz jel tabakasındaki gözlemlere aktararak elektroforez kabının büyüklüğüne göre belirlenmiş voltajda elektrik gücü uygulanmaktadır. Elektrik gücü bantlar jel kabının ortasını geçecek süre uygulanmaktadır. Elektroforez işleminden sonra, jel kabı elektroforez kabından çıkartılarak jel tabakasının UV ışık altında fotoğrafı çekilmekte, markere karşı PCR ürünleri kıyaslanmaktadır. Agaroz jel tabakası üzerindeki bantların (gen fragmanları) UV ışığı altında görünmesini sağlamak için Agaroz jel hazırlanırken Ethidium Bromid (fluoresanli boya) eklenmektedir. Bu görüntü incelendiğinde, Markerde bulunan gen fragmanlarının jel tabakasındaki seviyelerine göre, PCR ürünlerinde gen fragmanlarının olup olmadığını, varsa da seviyelerinin doğru olup olmadığını kontrol edilmektedir (Enzmann, kişisel görüşme, 2001; Miller, 1998; Özerol, 2001).

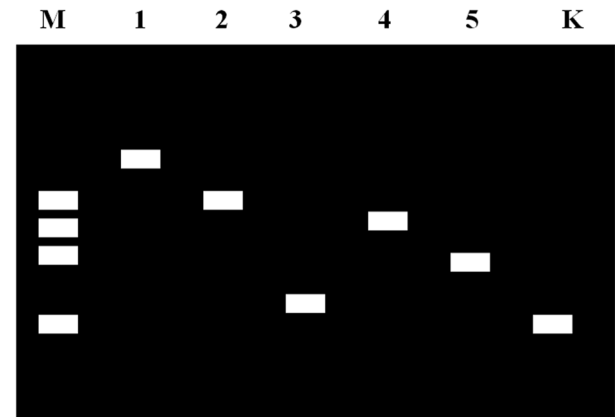
UV-fotoğrafında, örnek PCR ürünüde virus genlerine karşı kopyaları oluşmuşsa sonuç negatif olup, siyah görünmektedir (Şekil 3, No:5). PCR ürünüde şüpheli virus varsa, markerlerin hizasında, parlak beyaz çizgi görülmektedir (Enzmann, kişisel görüşme, 2001) (Şekil 2, 3).

Reamplifikasyon

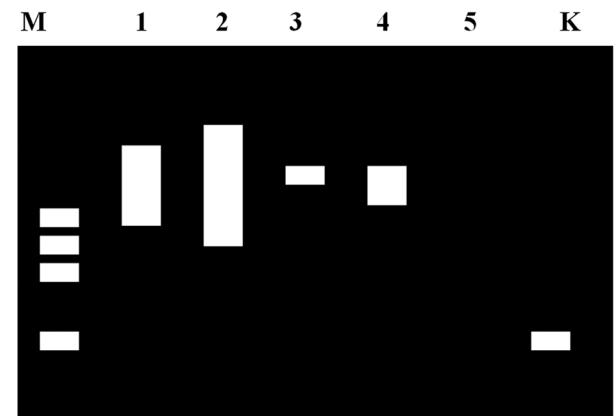
UV-fotoğrafı kontrolünde kuşku bir durumla karşılaşırsa, yukarı doğru çıkan bir beyazlık varsa, virus genlerinin sadece bir kısmı görünür hale gelmiş, diğer parçalar eksik kalmışsa (Şekil 3, No:1, 2, 4) ve virusun varlığından eminsek reamplifikasyon uygulanmalıdır (Enzmann, kişisel görüşme, 2001).

Yeniden amplifikasyon işlemi PCR ürünlerinden biriyle yapılmaktadır. Primer çiftleri kullanılan PCR ürünlerinin özelliklerine göre, daha kısa gen fragmanları oluşturacak şekilde ayarlanmaktadır. Reamplifikasyon, G-ve NV genlerinin tüm fragmanları elde edilene kadar tekrarlanmaktadır

(Enzmann, kişisel görüşme, 2001; Miller, 1998).



Şekil 2. VHSV G-Genine ait gen fragmanlarının UV-fotoğrafı 1.



Şekil 3. VHSV G-Genine ait gen fragmanlarının UV-fotoğrafı 2

cDNA ilk PCR ile amplifiye edildiğinde sınırlarını sense ve antisense primerlerin oluşturduğu G-ve NV genlerinin fragmanları ve ara fragmanları oluşturulup çoğaltılmaktadır. Reamplifikasyonda ise ilk PCR sonucunda elde edilen PCR ürünlerinden en az biri alınarak, bu gen fragmanından daha kısa gen fragmanları elde edilmektedir. Eğer reamplifikasyon, PCR ürünü bu gen fragmanının başından ya da sonundan başlayan bir gen fragmanı amplifiye edilecekse buna "*semi-nested PCR*", bu gen fragmanının ortasındaki herhangi bir yerden bir gen fragmanı amplifiye edilecekse "*nested-PCR*" adı verilmektedir (Enzmann, kişisel görüşme, 2001).

Gen Fragmanlarının Jelden Geri Kazanılması:

Tüm gen fragmanları elde edildiğinde, her biri yaklaşık 90 µl olan PCR ürünü örnekleri *ayırma işlemine* tabi tutulmaktadır. Gen fragmanlarının geri kazanılması yeni bir Agaroz jel elektroforez işlemi ardından Amicon tüpleri ile yapılmakta, bu işlem sonucunda çsDNA gen fragmanları saf olarak elde edilmektedir (Enzmann, kişisel görüşme, 2001).

G-ve NV Genlerinin Dna Dizi Analizi (Sekans)

Gen fragmanlarının nükleotid dizi analizinin yapılabilmesi için öncelikle Sekans-PCR yapılması zorunludur. Bu yöntemle zincir uzaması sonlandırılmakta, floresan-markajlı ddNTP (di-desoksi-nükleotid-tri-fosfat)'li gen-fragmanları elde edilmektedir (Durmaz, 2001). Enzmann'ın (kişisel görüşme, 2001) yapmış olduğu sekans çalışmalarında VHSV ve IHNV RNA'larının 11 000'in üzerinde nükleotidden oluştuğu saptanmıştır.

Sekans-PCR

Sekans-PCR işlemi esnasında çsDNA gen fragmanı, ısı etkisiyle açılarak tsDNA oluşturulmakta ve negatif sarmala (3'-5') sense, pozitif sarmala (5'----3') da antisense primer bağlanmaktadır. Sekans-PCR'da amaç tsDNA fragmanı elde etmek olduğundan tüpe sadece bir primer konulmakta ve Ampli-Taq-DNA polimeraz enzimi varlığında DNA sarmallarının komplementeri oluşturulmaktadır. Bu işlemde kullanılan TR-mix substratı içinde hem dNTP hem de ddNTP bulunduğu, sarmal komplementlerinin oluşumu anında rastlantısal olarak bir dNTP bağlandığında zincir üretimi devam etmekte, bir ddNTP bağlandığında ise o zincirin üretimi durmakta, başka bir nükleotid bağlanamamaktadır. Böylece, o gen fragmanının tamamını oluşturan nükleotid zincirinin ddNTP'lerle kesilmiş değişik uzunluklarda ve sayıda floresan markajlı gen-fragmanları oluşturulmuş olmaktadır (Durmaz, 2001).

Sekans-PCR işlemi için kullanılan primerler Amplifikasyon-PCR işleminde kullanılanlardan farklıdır. Amplifikasyon-PCR'de hem sense ve hem de antisense primerler aynı tüpe konulurken, Sekans-PCR'de her Eppendorf tüpüne sadece bir sense ya da antisense primer konulmaktadır. Ayrıca Amplifikasyon-PCR'de primer yoğunluğu 10 pmol (pikomol) iken, sekans primerlerinin yoğunluğu sadece 1.5 pmol'dür. Sekans-PCR işleminde döngü sayısı daha az olup, işlem 2.5 saat kadar sürmektedir.

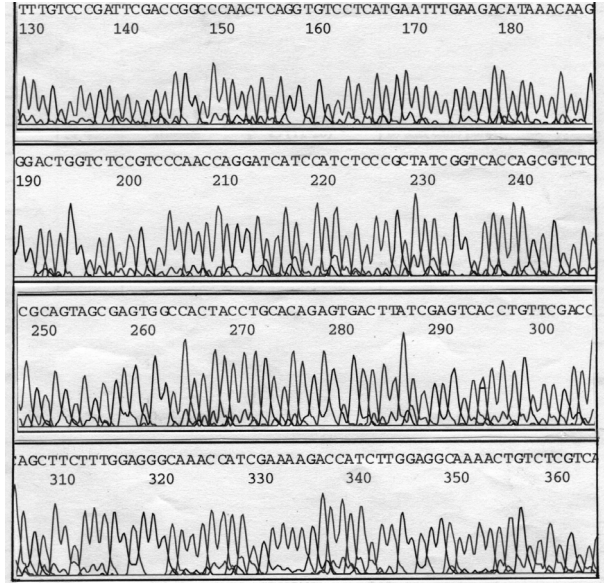
Presipitasyon (Çöktürme)

Bu işlem, Sekans-PCR işlemi esnasında kullanılmamış olan ddNTP'lerin ve diğer kimyasalların temizlenerek, markajlanmış ddNTP'li nükleotid zincirlerinin saf olarak elde edilmesi için uygulanmaktadır. Presipitasyon işleminde DNA, alkol ile presipite olarak içinde bulunduğu sıvıdan ayrılmakta, santrifüj yardımıyla da dibe çökmesi sağlanmaktadır. Sıvı içinde kalan tüm diğer maddeler ise atılmaktadır. Böylece markajlanmış nükleotidli gen fragmanları saf olarak elde edilmekte ve bu ürüne *Sekans-PCR ürünü* adı verilmektedir (Enzmann, kişisel görüşme, 2001).

DNA Dizi Analizi (Sekans İşlemi)

Sekans işlemi, yani gen fragmanlarının nükleotid dizi sırasının

belirlenmesi DNA-Sekans cihazı ile yürütülmektedir. Bu cihazla markajlanmış nükleotidler tespit edilerek nükleotid dizileri saptanmaktadır. Bu işlem için bilgisayara özel bir program yüklenmektedir. İşlem sonucunda gen fragmanlarının DNA dizilimlerini Sekans Grafiği (Şekil 4) ve Sekans Grafiği Değerlendirme Tablosu (Şekil 5) şeklinde görmek ve bilgisayar çıktısını almak mümkündür. İşlem, Sekans Laboratuvarında yürütülmekte ve ayrı bilgi ve beceri gerektirmektedir (Enzmann, kişisel görüşme, 2001).



Şekil 4. Sekans Grafiği (130-360. Nükleotid aralığı) (Enzmann, 2001, yayınlanmamış veriler). A=Adenin, C=Cytosin, G=Guanin, T=Timin.

121 ACGATTCTT TGTCCCATT CGACCGGCC AACTCAGGTG TCCTCATGAA TTTGAAGACA
181 TAAACAAGGG ACTGGTCTCC GTCCCAACCA GGATCATCCA TCTCCCGCTA TCGGTCAACCA
241 GCGTCTCCG AGTAGCGAGT GGCCACTACC TGCACAGAGT GACTTATCGA GTCACCTGTT
301 CGACCAGCTT CTTGGAGGG CAAACCATCG AAAAGACCAT CTTGGAGGCA AAACCTGTCTC

Şekil 5. Sekans Grafiğini Değerlendirme Tablosu (121-360. Nükleotid aralığı) (Enzmann, 2001, yayınlanmamış veriler). A=Adenin, C=Cytosin G=Guanin, T=Timin, N=Saptanamayan Nükleotid.

Viral Suşlar Arasındaki Akrabalığın Saptanması

Viral suşlar arasındaki akrabalığın saptanması, hastalık kaynağının belirlenmesi, dolayısıyla hastalıkla mücadelede önemlidir. *Aliquement* (çok sayıda sekansın yanyana yazılıp karşılaştırılması) adı verilen bu işlem, sekans sonuçlarına göre yapılmaktadır. İşlem, GCG-Paket Programı içinde bulunan Pile-Up Translate Programı ile yapılmaktadır. Ancak, bu program çalıştırılmadan önce Sekans Grafiği (Şekil 4) ve Sekans Grafiği Değerlendirme Tablosu (Şekil 5), her bir nükleotid tek tek kontrol edilerek tablonun doğruluğu kontrol edilmelidir. Zira bilgisayar bazı üst üste gelen pikleri yanlış değerlendirmekte ya da hiç değerlendirememektedir. GCG-Programı çerçevesinde, virusun elde edilmiş olan sekans verileri kaydedilerek daha önceki verilerle kıyaslanmaları sağlanmaktadır. VHS ve IHN viruslarında mutasyonların en çok görüldüğü genetik kısım G-ve NV genleri olduğundan, PCR bu genlerle yapılmaktadır. Sekans işlemi ve virusların akrabalıklarının belirlenmesinde

mutasyonların en belirgin olduğu G-geninin incelenmesi yeterli olmaktadır (Enzmann, kişisel görüşme, 2001). Enzmann ve diğ. (2000) VHS virusları üzerinde yapmış oldukları çalışmada, ilk identifiye edilen VHS-suşlarından VGP (VHS-Glukoprotein-Geni)'yi temel almışlardır.

Üç aylık kurs süresince yapılan virus identifikasyonları sonucunda "Glasaal" ve "142-96" suşlarına uyum sağlayan VHS virusları saptanmıştır. Şekil 6'da "Glasaal ve 142-96 VHSV suşlarının VGP temel alınarak DNA dizisinin karşılaştırılması ve kodonların oluşturdukları amino asitler" bir kısmı, Şekil 7'de "VHS Suşlarının Akrabalık Düzeyleri" sunulmuştur (Enzmann, yayınlanmamış veriler, 2001).

Nukleotid dizini:	
VGP 1	ATGGAATGGAACACTTTTCTTGGTGATCTTGATCATCATCAATAAGAG
GLAS 1CT.....
142-96 1
Aminoasit dizisi:	
VGP 1	M E W N T F F L V I L I I I K S
GLAS 1F.....
142-96 1
VGP 51	CACCACACCACAGATCACTCCAACGACCTCCGGTCGAAAACATCTCGACGT
GLAS 51G..T.....
142-96 51
VGP 18	T T P Q I T Q R P P P V E N S T
GLAS 18
142-96 18
VGP 751	TGCACAGTGACATTCTGCGGGACAGAATGGATCAAGACTGAOCTGGGGGA
GLAS 751T.....C.....
412-96 751T.....G.....T.....
VGP 251	C T V T F C G T E W I K T D L G D
GLAS 251
142-96 251A D.....
VGP 801	CCTGATCCAGGTGACAGGACCGGGGGCAGGAAACTGACTCCAACA
GLAS 801T.....G.....A.....
142-96 801	T.....A.....
VGP 268	L I Q V T G P G G T R K L T P N
GLAS 268A.....K.....
142-96 268E.....

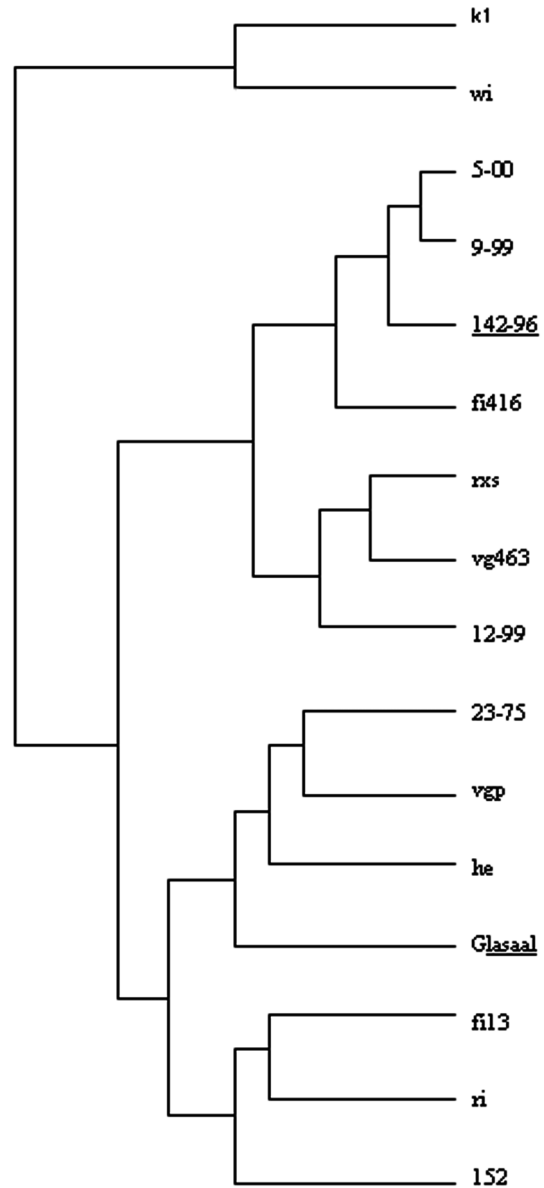
Şekil 6. Glasaal ve 142-96 VHSV suşlarının VGP temel alınarak DNA dizisinin karşılaştırılması ve kodonların oluşturdukları amino asitler (Enzmann, 2001, yayınlanmamış veriler). **Nukleotidler:** A=Adenin, T=Timin, C=Citosin, G=Guanin, **Aminoasitler:** A=Alanin, C=Cysteine, D=Aspartic acid, E=Glutamic acid, F=Phenylalanine, G=Glycine, H=Histidine, I=Isoleucine, K=Lysine, L=Leucine, M=Methionine, N=Asparagine, P=Proline, R=Arginin, S=Serine, Q=Glutamine, T=Threonine, V=Valine, W=Tryptophan, Y=Tyrosine. VGP= VHS-Glukoprotein-Geni, GLAS=VHS'nin Glasaal-Serotipi, 42-96=VHS'nin serotipi, =Aynı nukleotid ya da Aminoasit.

Not: 1) VGP DNA dizisi 1500'den fazla nukleotidden oluşmaktadır. Burada, VGP dizisine göre diğer suşlardaki nukleotid ve aminoasit düzeyindeki mutasyonlardan sadece birkaçı gösterilmiştir. **2)** 3 adet Nukleotid (=kodon) bir aminoasit oluşumunu sağlamaktadır.

Sonuç

Balık hastalıkları balıklarda ölümlere neden olarak hem ekonomik kayıplara, hem de zaten yetersiz olan gıda kaynaklarının azalmasına yol açmaktadır. Bu kayıpların önüne geçmek için bilim adamları araştırmalar yapmakta, birçok ülke uygun yasal düzenlemelerle milli servetlerini korumaya yönelik çalışmalarda bulunmaktadır. Koruyucu hekimliğin önemini iyice anlaşıldığı çağımızda, alınan bu önlemlerle sadece kayıpların önüne geçilmiyor, ayrıca sağaltım amacıyla kullanılan ilaçların daha kontrollü kullanılması ile insan sağlığı

da direkt olarak korunmuş olmaktadır. Viral hastalıkların sağaltımının olmaması ve %100'lere varan ölümlere yol açmaları nedeniyle, koruyucu önlemlerin alınması kayıpların önüne geçmek için daha da önem kazanmaktadır. Avrupa Birliği 91/67/EEC No'lu genelgesinde viral hastalıklardan VHS ve IHN'yi kapsamına almış, 2001/183/EEC No'lu direktifi ile de teşhis yöntemlerini karara bağlamıştır. Avrupa Birliği, almış olduğu bu kararlarla, nakilleri yapılacak olan balıkların ya da balık yumurtalarının, direktifte belirtilmiş olan hastalıklardan arındırılmış olmasını talep etmektedir. Avrupa Birliği'ne entegrasyon aşamasında bulunan ve balık yetiştiriciliğinde oldukça büyük potansiyele kavuşmuş olan ülkemiz de bu genelgelere uymak durumunda kalacaktır.



Şekil 7. VHS Suşlarının Akrabalık Düzeyleri (Enzmann, 2001, yayınlanmamış veriler). **142-96 ve Glasaal=** Kurs süresince teşhis edilen VHS Suşlarının dahil edildiği VHS Serotipleri; **VGP=** VHS Glukoprotein Geni.

Yetiştiriciliği yapılan alabalıklarda önemli ekonomik kayıplara neden olan VHS ve IHN hastalıklarının, gerek rutin gerekse de ayırıcı tanıları ülkemizde henüz yeterli düzeyde yapılamamaktadır. Bu derlemede anlatılmış olan RT-PCR tekniğinin, sadece viral balık hastalıklarının tanısında değil, bakteriyel ve paraziter hastalıkların da hızlı ve güvenilir tanısındaki açığımızın giderilmesinde katkısının olacağı düşünülmektedir. İdentifiye edilen virus genomunun sekans işlemi ile belirlenmesiyle de ülkemiz balıklarında hastalıklara neden olan virus suşları saptanabilecek, virus suşları arasındaki akrabalık düzeyinin belirlenmesiyle de hastalık kaynakları ortaya konularak hastalıklarla mücadelede daha etkin sonuçlar elde edilmiş olacaktır.

Kaynakça

- Anonym, 91/67/EEC, Concerning the animal health conditions governing the placing on market of aquaculture animals and products. Official Journal L 046, 19/02/1991, p. 0001-0018.
- Anonym, 2001/183/EEC, Laying down the sampling plans and diagnostic methods for the detection and confirmation of certain fish diseases and repealing decision, Official Journal L 067, 09/03/2001, p. 0013-0017.
- Anonym, 1999. Resmi Gazete. 30 Haziran 1999 tarih ve 23388 sayılı.
- Durmaz, R., 2001. Sekans of DNA (in turkish), p. 169-171. In R. Durmaz [eds.], Practical Molecular Microbiology (in Turkish). Nobel Tıp Kitap Evleri Ltd. Şti.
- Bruchhof, B., O. Marquardt, P.-J., Enzmann, 1995. Differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses by reverse transcriptase-dependent polymerase chain reaction. J. Vir. Meth. 55:111-119.
- Enzmann, P.-J., D. Fichtner, S. Bergmann, J. Rapp, 2000. Zur Epidemiologie der VHS in Deutschland: Gibt es neue VHS-Stämme, die für unsere Aquakultur gefährlich werden können? VIII.Tagung der Deutschen Sektion der European Association of Fish Pathologists (EAFP). Potsdam/Brandenburg. 82-90.
- Köksal, F., 2001. Amplification of Nucleic Acids (in Turkish), p. 15-34. In R. Durmaz [eds.], Practical Molecular Microbiology (in Turkish). Nobel Tıp Kitap Evleri Ltd. Şti.
- Miller, T., 1998. Development and evaluation of a RT-PCR directly from organs and blood for routine virus detection and differential diagnosis of VHS and IHN of salmonids. Doctorate.
- Miller, T. A., J. Rapp, U. Wasthuber, R. W. Hoffmann, P.-J. Enzmann, 1998. Rapid and sensitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells. Dis. Aquat. Org. 34: 13-20.
- Miller, T., J. Rapp, J.-P. Enzmann, 1998. Weiterführende Arbeiten zur VHSV/IHNV-Diagnostik mittels PCR direkt aus Organmaterial. VII. Tagung der Deutschen Sektion der Eur. Ass. Of Fish Pathol., Nordrhein-Westfalen. 74-80.
- Plumb, J. A., 1999. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Iowa State University/Ames.
- Özerol, H. İ., 2001. Determine of Amplificate Products (in turkish), p. 57-74. In R. Durmaz [eds.], Practical Molecular Microbiology (in Turkish). Nobel Tıp Kitap Evleri Ltd. Şti.