

Alabalıklarda (*Oncorhynchus Mykiss*, Walbaum) Viral Hemorajik Septisemi (VHS) Hastalığının Teşhisi İçin Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Yönteminin Geliştirilmesi^[*]Uğur DEĞİRMENCI^{1*}, Haşmet ÇAĞIRGAN¹¹Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Bornova, İZMİR

Öz: VHS, enfekte balık dokusundaki virüsün, duyarlı doku kültürlerinde izolasyonundan sonra ELISA, virüs nötralizasyon, immunofloresans, immuno-peroksidaz ve komplement fiksasyon gibi serolojik testlerle teşhis edilmektedir. ELISA, tekrarlanabilir olması, kullanımının basit olması, çabuk yapılabilmesi ve ucuz olmasıyla diğer serolojik testlere göre daha çok tercih edilmektedir.

Bu çalışmada VHS antijenini tespit edebilecek tavsandan elde edilen sadece bir antikor kullanıldı. Bu antikor biotin ile işaretlenerek testte konjugat olarak kullanıldı. Üretilen antikorun (anti-VHSV F1 γ -globulin fraksiyonu) protein konsantrasyonu 28 mg/ml olarak ölçüldü. Mikroplak kuyucukları 10 mikrogram/mililitre (μ g/ml) anti-VHSV γ -globulin fraksiyonu ile kaplandı. Daha sonra şüpheli örnek ilave edildi. Örnekteki VHSV biotinlenmiş anti-VHSV γ -globulin fraksiyonuna bağlandı. Bu aşamadan sonra ilave edilen horse radish peroksidase (HRP) enzimi ile işaretli avidin, konjugattaki biotin ile bağlandı. Son olarak tetramethylbenzidine substrat (TMB) eklenmesiyle renk şekillendi ve ELISA okuyucuda 450 nonometrede (nm) okutuldu. Bu çalışmada geliştirilen ELISA yöntemi ile bilinen tüm VHSV alttipleri (07.71, HE, 23.75) tespit edilebilmektedir. Yine bu yöntem VHSV'ye oldukça spesifik ve İnfeksiyöz Hematopoetik Nekrozis Virüsü (IHNV), Pike Fry rhabdovirus (PFR), Perch rhabdovirus (PR) ve bilinen tüm İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis Virüsü (IPNV) serotipleriyle çapraz reaksiyon vermemektedir. Sonuç olarak geliştirilen bu ELISA yöntemi 80 nanogram (ng) virüs proteinini ve DKID₅₀ değeri 10^{4.75}/0,1 ml olan virüsü tespit edilebilmektedir.

Anahtar sözcükler: ELISA, biotin-avidin, alabalık, VHSV.

^[*]Bu makale sorumlu yazarın doktora tezinden hazırlanmıştır.

The Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Method for Diagnosis of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) Disease in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum)

Abstract: VHS can be diagnosed by the isolation of virus from infected fish in an appropriate cell line then identified by different serological techniques such as ELISA, virus neutralization, immunofluorescence, immunoperoxidase and complement fixation tests. ELISA is over to the other serological tests by the repeatability, simplicity, rapidity and cheapness.

In this research only one antibody which raised in rabbit was used for the detection of VHSV antigen. Furthermore, this antibody was labeled with biotin and used as test conjugate. Estimated protein concentration of produced antibody (anti-VHSV F1 γ -globulin fraction) was 28 mg/ml. The microwells were coated with 10 μ g/ml anti-VHSV γ -globulin fraction. Then the suspected samples were reacted. If the samples were containing virus, biotinylated anti VHSV γ -globulin fraction binds to the antigen and biotinylated γ -globulin fraction react with HRP labeled avidin. The colour is developed and read by a reader following addition of TMB substrate. In the research, developed ELISA was detecting all known VHSV Subtypes (strain F1, HE, 23.75). Also this developed ELISA was highly specific to VHSV and was not giving the cross reaction with other fish viruses such as IHNV, PFR, PR and all known IPN serotypes. As a result, sensitivity of that ELISA method is 10^{4.75}/0,1 ml DKID₅₀ and method can detect 80 ng virus protein.

Keywords: ELISA, biotin-avidin, *Oncorhynchus mykiss*, VHSV.

^[*]This article was prepared from the responsible author's doctoral thesis.

GİRİŞ

Viral hemorajik septisemi hastalığı (VHS), başta alabalıklar olmak üzere tüm salmonid balıklarda ve deniz balıklarında katstrofik kayıplara yol açan viral bir hastalıktır. VHS ilk defa Schäperclaus, (1938) tarafından tanımlanmış olmakla beraber ilk izolasyon 1963 yılında Danimarka'da Jensen tarafından gerçekleştirilmiştir (Jensen, 1965). Bundan sonra hastalık Avrupa, Amerika ve Asya kıtalarında yer alan birçok ülkede bildirilmiştir. Ülkemizde ise hastalık etkeni ilk olarak 2006 yılında Trabzon'da kültürü yapılan kalkan balıklarından izole edilmiştir (Kalaycı et al., 2006; Nishizawa et al., 2006).

Avrupa'da 1991 yılı için VHS kaynaklı maddi zararın £40 milyon olduğunu bildirmiştir (Skall et al., 2005). Ölüm oranı su sıcaklığına, balık büyüklüğüne ve türüne göre değişmekle beraber % 80'lere ulaşırken, morbidite % 100'lere ulaşabilmektedir (Olesen, 1998).

VHS, ülkemiz Hayvan Sağlığı ve Zabıtası Kanunu'na, Avrupa Topluluğu ilgili konsey direktiflerinde ve Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü'nce (OIE) ihbarı ve itlafı zorunlu hastalıklar listesinde yer almaktadır (Anonim, 2006; Anonim, 2007; Anonim, 2010). Enfeksiyonu atlatan balıklar ömür boyu taşıyıcı olarak kalabilmektedir (Enzmann and Konrad, 1985) ve taşıyıcı ya da hasta balıklar genital sıvıları, yumurtaları, dışkıları yoluyla etkeni buldukları ortama yayabilmektedirler (Vestergard

Jorgensen, 1970; Wolf, 1988). Bu nedenle hastalığın erken teşhisi, önlemlerin erken alınarak başka işletmelere bulaşmasının önlenmesi bakımından önemlidir.

Olesen et al., (1993) poliklonal ve monoklonal antikorların kullanıldığı nötralizasyon testile etkenin tek serotipinin olduğunu ve bunun da 3 subtipinin (Subtip I: F1 ve Heddam. Subtip II: 23/75, DK-5131 ve DK-5276. Subtip III: DK-5151 ve DK-5422) bulunduğunu bildirmişlerdir. VHS'nin tanısında, şüpheli dokuda antijenin veya serumda spesifik antikorun arandığı serolojik yöntemler ve şüpheli dokuda virüse spesifik RNA'ların arandığı moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Kesin teşhis için virüsün izolasyonundan sonra serolojik veya moleküler olarak tanımlanması gereklidir. Virüsün teşhisinde nötralizasyon testi altın standart olarak üstünlüğünü korumakla beraber bunun için gerekli hücre kültürü pahalı, zaman alıcı ve geniş laboratuvar imkanları gerektirmektedir (Way and Dixon, 1988). Enfeksiyonun bir an önce kontrol altına alınması için etkenin hızlı bir şekilde tespit edilmesine olanak sağlayan tarama testlerine gereksinim vardır. Bu amaçla hastalık belirtisi gösteren balıkların beyin, böbrek, dalak ve karaciğer dokularından hazırlanan homojenizatta, OIE tarafından da kabul edilen yöntemler arasında yer alan ELISA ile antijen taraması yapılması önem arz etmektedir.

ELISA testinin ana mantığı antijen ile antikorun birleşmesi ve bu birleşmenin görünür hale getirilmesidir (Önalın ve ark., 2016). Bu testin

basamaklarında kullanılan antijen, antikor ve diğer bileşenler değiştirilerek yeni metodlar geliştirilebilmektedir.

Bu çalışmada, VHSV'nin teşhisinde kullanılabilecek sadece bir antikorun kullanıldığı biotin-avidin sandviç ELISA yöntemi geliştirilmesi ve geliştirilecek bu test yöntemiyle hastalık etkeninin daha hızlı ve ucuz bir şekilde teşhis edilebilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışma ELISA testinin geliştirilmesinde kullanılacak antijen ve antikorların hazırlanması ve ELISA testi basamaklarından oluşmaktadır. Buna göre önce ELISA'da kullanılacak hücre kültürleri, virüsler, antikor ve konjugatlar aşağıda belirtilen işlemler dahilinde hazırlandı.

Virüs ve hücre kültürü: Çalışmada kullanılan saha izolatu VHSV F1 ve IPNV Taba izolatları Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuvarı'ndan (Türkiye), diğer virüsler ve hücre hatları Avrupa Topluluğu Balık Hastalıkları Referans Laboratuvarı'ndan (Danimarka) Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü (Türkiye) aracılığı ile temin edildi.

Referans suş VHSV F1 ve saflaştırılmış hali, antikorların elde edilmesi ve ELISA testinin çeşitli aşamalarında kullanıldı. VHSV-I (strain 07.71), VHSV-II (strain HE), VHSV-III (strain 23.75), PFR, PR, IHN, IPNV (Ab, Sp, VR299 serotipleri) saha izolatu VHSV F1 ve IPNV Taba izolatları ELISA testinin özgünlüğünün belirlenmesinde kullanıldı.

Hücrelerin üretilmesinde % 10 Fetal Bovine Serum (Biocrom AG, S0113), % 1 oranında HEPEs Buffer 1 M (Biological Industries, Cat. 03-025-1B), % 1 oranında Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Solution (Biological Industries, Cat. 03-033-1B) ilave edilmiş olan Eagle's -Minimal Essential Medium (EARLE modifikasyonu 1x, Biocrom AG, FG 0325) hücre kültürü vasatı kullanıldı. Araştırmada kullanılan IHN ve PFR virüsleri, epithelioma papulosum cyprini hücre kültüründe (EPC), diğer virüsler ise bluegill fry hücre kültüründe (BF-2) 15°C'de üretildi.

Virüsün saflaştırılması ultra santrifüjasyon yöntemi (Way and Dixon, 1988) ile yapıldı. Antikor elde etmek için kullanılan antijenin, protein miktar tayini Lowry yöntemine (Hudson and Hay, 1991) göre ve titrasyonu 96 gözlü hücre kültürü mikropaklarında (Costar, Sigma-Aldrich) BF-2 hücre kültüründe gerçekleştirildi. Titrasyonda DKID₅₀ değerleri Spaerman ve Kaerber metodu kullanılarak hesaplandı (Beard, 1989). Araştırmada kontrol test olarak ticari VHS Ag ELISA kiti (Test-line, Çek Cumhuriyeti) kullanıldı.

Anti-VHSV F1 γ -globulin fraksiyonu elde edilmesi ve biotinlenmesi: Anti-VHSV F1 serumu Ege Üniversitesi deney hayvanları ünitesinden temin edilen 2 kg canlı ağırlıkta 2 adet Yeni Zelandalı tavşanına saflaştırılmış antijen verilerek elde edildi. İmmünizasyon işlemi Anderson and Dixon (1989), bildirdiği immunizasyon protokolüne göre gerçekleştirildi. Elde edilen VHSV F1 serumundan γ -globulin fraksiyonu saflaştırılması için Adams (1992), tarafından bildirilen metotla sodyum sülfat ile çöktürülerek gerçekleştirildi. Konjugat olarak biotinlenmiş tavşan anti VHSV F1 γ -globulin kullanıldı. Antikorun biotinilasyonu, Gueston et al., (1979)'un bildirdiği metoda göre gerçekleştirildi.

ELISA: Bu araştırmada tek antikorun kullanıldığı biotinavidin sandviç antijen ELISA metodu ile geliştirildi. Reaktiflerin optimum miktarları ön denemelerle değişik konsantrasyonları kullanılarak belirlendi. Geliştirilen ELISA testinin genel uygulama şekli aşağıdaki gibidir: 96 gözlü düz tabanlı plaklar (Greiner bio-one, Germany) pH 9,6 karbonat bikarbonat buffer ile sulandırılmış tavşan anti-VHSV F1 γ -globulin fraksiyonu (10 μ g/ml) ile her bir göze 100 μ l konularak kaplandı. Kaplama işleminden sonra mikropak kuyucukları 2 kez 2 dakika süreyle phosphate buffered saline (PBS, pH: 7,4) eklenerek yıkandı ve bloklayıcı işlemine geçildi. Bunun için kuyucuklara karbonat-bikarbonat buffer pH 9,6 'da hazırlanmış % 1,5 bovine serum albumin (BSA, Biocrom AG, S 0113) 200 μ l eklenilip, 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda 1 saat bekletildi. Süre sonunda 3 kez 2 dakika süreyle PBS (pH 7,4) eklenerek yıkandı. Antijen ilavesi basamağına geçildi. Bu basamakta 1/10 oranında PBST (% 0,05 tween 20 ilave edilmiş PBS) ile sulandırılmış 100 μ l şüpheli materyal ilave edildi. Mikropak 23°C' de 1 saat nemlendirilmiş kapalı bir kap içinde bekletildi. Bekleme bitiminde 3 kez 2 dakika süreyle PBST ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra konjugat ile inkubasyona tabi tutuldu. Konjugat olarak Gueston et al., (1979) bildirdiği metoda göre biotinle işaretlenmiş anti-VHSV F1 γ -globulin fraksiyonu kullanıldı. Konjugat 1/100 oranında % 1 BSA içeren PBST ile sulandırıldıktan sonra gözlere 100'er μ l ilave edilerek kullanıldı. Mikropak 23°C' de 1 saat inkube edildi. İnkubasyon sonrası 4 kez 2 dakika süreyle PBST ile yıkandı. Daha sonra her bir göze 1/4000 PBST + % 1 BSA ile sulandırılmış peroxidase

enzimiyle işaretlenmiş Avidin (extrAvidin peroxidase, Sigma) 100'er μ l ilave edilerek 1 saat inkube edildi ve süre sonunda 5 kez 2 dakika PBST ile yıkandı. Antijen antikor birleşmesinin görünür hale gelebilmesi için tek bileşenli kullanıma hazır TMB substrat (Sigma, Cat. T4444) ilave edildi. İnkubasyon oda sıcaklığında yapıldı. Renklenmenin oluşması için en çok 10 dakika beklendi. Rengin oluşumu kuyucuklara 50 μ l % 10 H₂SO₄ eklenerek durduruldu ve oluşan renk optik dansite (OD) 450 nm'de ELISA optik okuyucuda (Molecular Devices VERSAmax® microplate reader, USA) okunarak değerlendirildi.

Testin özgünlüğünün belirlenmesi: Özgünlük testi, geliştirilen testin hedef antijenin dışında başka antijenlere de duyarlı olup olmadığının belirlenmesini hedefler. Hedef antijenin dışında başka antijenlere duyarlı olmaması beklenir. Aksi durumda testin özgün olmadığı kabul edilir. Testin özgünlüğünün belirlenmesi için antijen eklemeye basamağında şüpheli materyal olarak, VHSV-F1 (referans suş ve saha izolatu), VHSV-I, VHSV-II, VHSV-III, IPNV Taba izolatu, IPNV Ab, IPNV Sp, IPNV VR299 serotipleri ve rhabdo virüsler familyasından PFR, PR, IHN virüsleri eklendi. Yine antijen eklemeye basamağında doku kültürü kaynaklı çapraz reaksiyonların olup olmadığını belirlemek için de antijen yerine balık virüsü laboratuvarlarında sık kullanılan enfekte olmamış BF-2, EPC, rainbow trout gonad hücre kültürleri (RTG-2) kullanıldı. Testte negatif kontrol antijeni olarak kuyucuklara PBST eklendi.

Testin duyarlılığı: Testinin duyarlılığı, ölçülebilen en az antijen miktarının tespit edilmesi amacıyla gerçekleştirildi. Bu amaçla geliştirilen ELISA testi antijen eklemeye basamağında DKID₅₀ değerleri 10^{5,75}/0,1 ml olan VHSV ile enfekte hücre kültürü (BF-2) süpermatantı (DKS VHSV) 1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/1000 oranında sulandırıldıktan sonra ELISA testi tamamlandı. Aynı test protein miktarı 80 μ g.ml⁻¹ olan saflaştırılmış virüsün 1/20, 1/50, 1/100, 1/250,1/500, 1/1000 sulandırılmalarının kullanılmasıyla tekrarlandı. Böylelikle hem sayı yönünden hemde antijenin protein miktarı yönünden testin duyarlılığının belirlenmesi amaçlandı.

Testin değerlendirilmesi ve istatistiksel analiz: ELISA sonuçlarının değerlendirilmesinde sonuçların Ag P/Ag N ≥ 2 ve P>3xNSH+NO (Savigny and Voller, 1980; Nicholsan and Caswell, 1982; Medina et al., 1992) formülasyonlarına uygun olması esas alındı.

Ag P: Antijen pozitif kuyucuk OD_{450nm} değeri

Ag N: Antijen negatif kuyucuk OD_{450nm} değeri

P: Pozitif olarak değerlendirilen kuyucuklardaki OD_{450nm} değeri

NSH: Negatif kuyucuklarda okunan OD_{450nm} değerlerinin ortalamalarının standart hataları

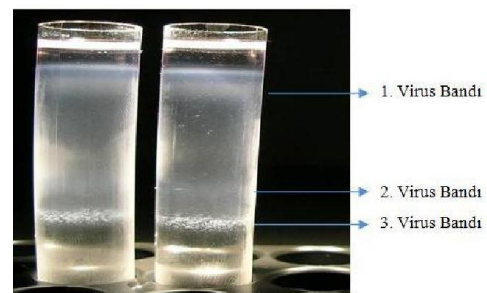
NO: Negatiflerin OD_{450nm} değerleri ortalaması

Çalışmada pozitif olduğu değerlendirilen kuyucuklarda okunan OD değerleri ile negatif olduğu değerlendirilen kuyucuklarda okunan OD değerleri arasında farkın istatistiksel yönden önemli olup olmadığı "İki Ortalama Arasındaki Farkın Önemlilik Testi" (Mann-Whitney U Testi) ile belirlendi (Sümbüloğlu ve Sümbüloğlu, 1997).

BULGULAR

Geliştirilen ELISA testinde kullanılmak üzere hazırlanan saflaştırılmış virüs, antikor ve konjugat, testin duyarlılığının ve özgünlüğünün yüksek olmasını sağladı. Elde edilen bu bulgular reaktiflerin başarılı bir şekilde üretildiğini göstermektedir.

Ultra santrifüjasyon yöntemiyle yapılan saflaştırma işleminde 3 bant şekillendi (Şekil 1) ve bu bantlar birleştirilip kullanıldı. Birleştirilen bantlardan elde edilen ürünün protein miktarı 80 μ g/ml olarak hesaplanmıştır. Saflaştırılmış virüsler (80 μ g/ml) immunize edilen tavşanlardan elde edilen antikorlarda Anti-VHSV F1 γ -globulin fraksiyonu protein miktarı ise 28 mg/ml olarak hesaplanmıştır.



Şekil 1: Sükröz gradient sonrası şekillenen virüs bantları.

Testin özgünlüğü ile ilgili çalışma bulguları: Yapılan çalışma sonucunda VHSV F1, saha izolatu VHSV, VHSV-I, VHSV-II, VHSV-III'ün eklendiği kuyucuklarda gözle ayırt edilen bir renklenme şekillenmiş ve ELISA okuyucuda okunan OD_{450nm} değerleri Ag P/Ag N ≥ 2 ve yine P>3xNSH+NO şartlarını sağladığı için pozitif olarak değerlendirildi. Bununla birlikte diğer antijenlerin bulunduğu gözler ise sayılan şartları sağlamadığından test negatif olarak değerlendirildi. Mann-Whitney U Testi ile de pozitif sonuç veren testlerde renklemenin olduğu ve olmadığı gözler arasında istatistikî açıdan farkın anlamlı olduğu da belirlendi ($p \leq 0,001$). Böylece geliştirilen ELISA testinin VHSV antijenlerinin dışındaki test edilen antijenlere karşı çapraz reaksiyon vermediği ve sadece aranan etkene özgün olduğu belirlendi. Özgünlük testi sonucunda ELISA okuyucuda okunan OD_{450nm} değerleri ve Ag P/Ag N oranları Çizelge 1'da verildi.

Tablo 1. Özgünlük testi sonucunda ELISA okuyucuda elde edilen OD_{450nm} değerleri ve Ag P/Ag N oranları.

Antijen 1/10 Sulandırma	Ag Pozitif (Ag P)	Ag Negatif (PBST) (Ag N)	Ag P/Ag N Oranı
VHSV F1	0,687	0,077	8,922
Saha izolatu VHSV	0,651	0,077	8,454
VHSV -I	0,664	0,077	8,623
VHSV-II	0,648	0,077	8,415
VHSV-III	0,655	0,077	8,506
IPNV AB	0,079	0,077	1,025
IPNV Sp	0,078	0,077	1,012
IPNV Vr 299	0,082	0,077	1,064
IPNV Taba	0,081	0,077	1,051
IHN	0,082	0,077	1,064
PFR	0,092	0,077	1,194
PR	0,078	0,077	1,012
BF-2	0,098	0,077	1,272
EPC	0,085	0,077	1,103
RTG-2	0,083	0,077	1,077

Ag Pozitif: Antijen pozitif kuyucuk OD_{450nm} değeri.

Ag Negatif: Antijen negatif kuyucuk OD_{450nm} değeri.

PBST : % 0.05 Tween 20 ilave edilmiş phosphate buffered saline, pH: 7.4.

Testin duyarlılığı ile ilgili çalışma bulguları: Antijen eklemeye basamağında DKID₅₀ değeri $10^{5.75}/0,1$ ml olan DKS'deki VHSV F1'in 1/2, 1/5 ve 1/10 sulandırmalarının kullanıldığı teste ELISA okuyucuda okunan OD_{450nm} değerleri Ag P/Ag N ≥ 2 ve yine P>3xNSH+NO şartlarını sağladığı için sonuçlar pozitif olarak hesaplandı ve gözle kolayca ayırt edilebilir bir renklenme gözlemlendi. Buna rağmen 1/50, 1/100 ve 1/1000 sulandırmalarda sonuçlar negatif olarak hesaplandı. Yine duyarlılığı belirlenmesi için saflaştırılmış virüsün (80 µg/ml) kullanıldığı çalışmada ise 1/100 virüs sulandırmasına kadar ELISA okuyucuda okunan OD_{450nm} değerleri Ag P/Ag N ≥ 2 ve yine P>3xNSH+NO şartlarını sağladığı için sonuç pozitif olarak belirlendi. Ayrıca Mann-Whitney U Testi ile de pozitif sonuç veren testlerde renklemenin olduğu ve olmadığı gözler arasında istatistikî açıdan farkın anlamlı olduğu da belirlendi ($p \leq 0,001$). Buna göre geliştirilen ELISA testi 80 ng virüs proteinini ve DKID₅₀ değeri $10^{4.75}/0,1$ ml olan virüsü tespit edebilmektedir. DKS VHSV F1 ile yapılan duyarlılık testinde ELISA okuyucuda elde edilen OD_{450nm} değerleri ve Ag P/Ag N oranları Tablo 2'de ve saflaştırılmış virüs ile yapılan duyarlılık testinde ELISA okuyucuda elde edilen OD_{450nm} değerleri ve Ag P/Ag N oranları Tablo 3'de bildirildi.

Tablo 2. DKS VHSV F1 ile yapılan duyarlılık testinde ELISA okuyucuda elde edilen OD_{450nm} değerleri ve Ag P/Ag N oranları.

VHSV F1 Dilüsyonları (DKS)	Ag Pozitif (Ag P)	Ag Negatif (PBST) (Ag N)	Ag P/Ag N Oranı
1/2	0,655	0,089	7,359
1/5	0,642	0,089	7,213
1/10	0,612	0,089	6,876
1/50	0,165	0,089	1,853
1/100	0,104	0,089	1,168
1/1000	0,097	0,089	1,089

Ag Pozitif: Antijen pozitif kuyucuk OD_{450nm} değeri.

Ag Negatif: Antijen negatif kuyucuk OD_{450nm} değeri.

PBST : % 0.05 Tween 20 ilave edilmiş phosphate buffered saline, pH: 7.4.

Tablo 3: Saflaştırılmış virüs ile yapılan duyarlılık testinde ELISA okuyucuda elde edilen OD_{450nm} değerleri ve Ag P/Ag N oranları.

Saf VHSV (80 µg/ml) Dilüsyonları	Ag Pozitif (Ag P)	Ag Negatif (PBST) (Ag N)	Ag P/Ag N Oranı
1/20	0,685	0,089	7,696
1/50	0,594	0,089	6,674
1/100	0,582	0,089	6,539
1/250	0,167	0,089	1,876
1/500	0,124	0,089	1,393
1/1000	0,099	0,089	1,112

Ag Pozitif: Antijen pozitif kuyucuk OD_{450nm} değeri.

Ag Negatif: Antijen negatif kuyucuk OD_{450nm} değeri.

PBST : % 0.05 Tween 20 ilave edilmiş phosphate buffered saline, pH: 7.4.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmada ülkemizde laboratuvarlarda kullanılabilirlik ithal olmayan yerli, aranan antijene spesifik ve duyarlı bir ELISA yöntemi geliştirildi. ELISA testinin maliyet getiren en önemli parçası olan antikor ve konjugat kendi laboratuvar imkânlarımızla ve yüksek spesifikite ve özgünlükte elde edildi. Buda teşhis maliyetini düşürmektedir. İmmünizasyon için Way and Dixon (1988), 125–300 µg protein içeren saflaştırılmış virüs kullanmış ve yine Harlow and Lane (1988), tavşan immunizasyonu için tavsiye edilen partiküler antijenin 50 µg olmasının yeterli olabileceğinden bahsetmiştir. Bu çalışmada ise immunizasyon için 80 µg saflaştırılmış virüs proteini elde edildiği için immunizasyon için yeterli bir antijen elde edildiği anlaşıldı. İmmünizasyon sonrası elde edilen anti-VHSV F1 γ -globulin fraksiyonu protein miktarının 28 mg/ml bulunması ve bu antikorun aranan antijene özgün ve de duyarlı olduğunun yapılan testlerle ortaya çıkması virüs saflaştırılması ve antikor elde edilmesi işlemlerinin başarılı olduğunu göstermektedir.

Konjugat olarak Mourton et al., (1990, 1992) HRP ile işaretlenmiş monoklonal anti VHSV antikorunu kullanırken, Way and Dixon (1988), alkenfosfatazla işaretli γ -globulin fraksiyonu, Olesen and Vestergard-Jorgensen (1991), HRP ile işaretlenmiş poliklonal anti-VHSV antikorunu kullanmışlardır. Bu çalışmada ise konjugat olarak biotinle işaretlenmiş anti-VHSV γ -globulin fraksiyonu kullanıldı ve diğer çalışmalardan farklı olarak işaretleyici olarak, enzimler yerine biotin kullanıldı. Biotin diğer işaretleyicilere göre daha ucuz, proteinlerle konjugasyonu daha kolay olup, avidine olan afinitesi 10^{-15} M olup, monoklonal antikorun afinitesinden 10000 kat daha fazladır (Guesdon et al., 1979; Cagırgan, 1992). Yine biotin moleküler olarak küçük bir molekül (MW: 224 g/mol) olduğu için bağlandığı proteinlerin biyolojik aktivitelerinde kayba neden olmamaktadır. Bu özelliği nedeniyle yapılan testlerde sonucun duyarlılığını arttırdığı bildirilmiştir (Hsu and Raine, 1981). Çalışmamızda biotinin işaretleyici olarak kullanılması bu avantajları sayesinde testimizin duyarlılığının artmasına katkı sağlamıştır.

Geliştirilen biotin-avidin ELISA metodu değişik antijenler kullanılarak yapılan özgünlük testinde, tüm VHSV antijenlerini tiplerine bağlı olmaksızın tespit edebildiği görüldü. Bu sonuç geliştirilen metodun saha çalışmalarında VHS etkenlerini tanımlayabileceğini ortaya koymaktadır. Yine özgünlük testlerinde BF-2, EPC ve RTG-2 hücre kültürlerine karşı çapraz reaksiyonların varlığı araştırıldı. Way and Dixon (1988), yaptığı çalışmada ise EPC için çapraz reaksiyon verip vermediği araştırılırken BF-2 ve RTG-2 için araştırma yapılmamıştır.

Testin duyarlılığı ile ilgili bu çalışmada geliştirilen biotin-avidin ELISA DKID₅₀ değeri $10^{4.75}/0,1$ ml olan VHS virüsünün varlığını ortaya koymuştur. Yine saflaştırılmış VHSV ile yapılan duyarlılık testinde 80 ng virüs proteinini tespit edebildiği ortaya konmuştur. Olesen and Vestergard Jorgensen (1991), enfekte balık dokusundan ve doku kültüründe izolasyonla ELISA da teşhisi karşılaştırmış gelen şüpheli örneklerin % 80'nin doku kültüründe ve ELISA'da pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada antijen tanımda uygulanan ELISA'nın $1,4 \times 10^6/0,1$ ml'nin eşik değeri olduğunu ortaya konulmuştur. Ancak araştırmacıların HRP ile işaretlenmiş konjugat kullandıklarını rapor etmişlerdir. Olesen and Vestergard Jorgensen (1991), araştırma sonuçlarıyla biotinle işaretlemenin yapıldığı bu çalışma sonuçları karşılaştırıldığında geliştirilen ELISA'nın yaklaşık 14 kat daha duyarlı olduğu anlaşılmaktadır.

Çalışmanın ekonomik boyutu düşünüldüğünde ticari ELISA kitleri ile bir seferde en fazla 45 örneği birden test etmek mümkündür. Numuneler ayrı ayrı zamanlarda geldiğinde ise en fazla 12 örnek test edilebilmektedir. 45 örneklilik ticari kitlerin firmalara göre değişimle beraber fiyatlarının 750–1000 \$ (USD) civarlarında olduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın bir sonraki aşaması olan doğrulama (validasyon) aşaması yapıp maliyeti ortaya konduğunda ticari kitlere nazaran oldukça düşük bir maliyetle teşhisin mümkün olabileceği tahmin edilmektedir. Yine VHSV etkeninin ihbarı mecburi balık hastalığı etkeni olması nedeniyle ithalatta ve ihracatta balık ürünlerinde bu etkenin araştırılmasının ve buna yönelikte çok sayıda ELISA kitinin ilgili laboratuvarlarca satın alınmasının mecburiyeti vardır. Bu da ülke ekonomisindeki cari açık sorunlarından birine neden olmaktadır.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada geliştirilen biotin-avidin sistem ELISA metodu oldukça duyarlı ve özgün olduğu için VHSV etkeninin teşhisi amacıyla başarılı bir şekilde kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir. Ticari kit haline getirilmesi için doğrulama (validasyon) işlemi ve maliyet hesabı çalışmaları planlanabilir olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adams A., (1992).** Techniques in Fish Immunology: Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to Detect and Quantify Bacterial Pathogens in Fish Tissue, SOS publications, 43 Denormandie Ave., Fair Haven, NJ.07704-3303 USA, 177-182.
- Anderson DP. and Dixon OW., (1989).** Fish Biology Guide, U.S. Fish and Wildlife Service National Fish Health Research Laboratory, West Virginia, USA, 167.
- Anonim, (2006).** Council Directive 2006/88/EC of 24 October 2006. Official Journal of the European Union L, 328/14.
- Anonim, (2007).** 3285 Sayılı Hayvan Sağlığı Ve Zabıtası Kanununun 4 Üncü Maddesine Göre Tespit Edilen İhbarı Mecburi Hastalıklar Hakkında Tebliğ (Tebliğ No: 2007/32). Resmî Gazete, Tarih: 12 Temmuz 2007 Sayı: 26580.
- Anonim, (2010).** OIE Listed diseases: Updated: 04.01.2010, <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017/>. (25.01.20017).
- Beard CW., (1989).** Serological procedure. In: Purchase H.G., Lawrence, C., Arp, L.H., Domermuth, C.H., Pearson J.E. (Eds): A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Kendall/Hunt Publishing, Iowa, USA. 192-200.
- Cagırgan H., (1992).** The Development of New ELISA Assays for Detecting Serum Antibody Levels Against VHS and IPN in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), MSc Thesis, University of Plymouth, 92 (unpublished).
- Enzmann PJ. and Konrad M., (1985).** Inapparent infections of Brown trout with VHS-virus. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **5**, 81-83.
- Guesdon JL., Ternynck T. and Avrameas S., (1979).** The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **27** (8); 1131-1139pp.
- Harlow E. and Lane D., (1988).** Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 101.
- Hsu S. and Raine L., (1981).** Protein A, Avidin, and Biotin in Immunohistochemistry. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **29** (11); 1349-1353.
- Hudson L. and Hay FC., (1991).** Practical Immunology, Blackwell Scientific Publication, Oxford Great Britain, Third Edition, 4-6.
- Jensen MH., (1965).** Research on the virus of Egtved disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **126**, 422-426.
- Kalaycı G., İnacoglu S. and Ozkan B., (2006).** First isolation of viral haemorrhagic septisemia (VHS) virus from turbot (*Scophthalmus maximus*) cultured in the Trabzon coastal area of the Black Sea in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **26** (4); 157.
- Medina JM., Chang PW., Bradley TM., Yeh MT. and Sadasiv EC., (1992).** Diagnosis of infectious hematopoietic necrosis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* by enzyme-linked immunosorbent assay. *Dis. of Aquat. Org.*, **13**, 147-150.
- Mourton C., Bearzotti M., Piechaczyk M., Paolucci F., Pau B., Bastide JM. and de Kinkelin P., (1990).** Antigen-capture ELISA for viral haemorrhagic septicaemia virus serotype I. *J. Virol. Methods.*, **29** (3); 325-333.
- Mourton C., Romestand B., de Kinkelin P., Jeffroy J., Le Gouvello R. and Pau B., (1992).** Highly sensitive immunoassay for direct diagnosis of viral hemorrhagic septicemia which uses antinucleocapsid monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, **30** (9); 2338-2345.
- Nishizawa T., Savas H., Isidan H., Ustundag C., Iwamoto H. and Yoshimizu M., (2006).** Genotyping and Pathogenicity of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus from Free-Living Turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish Coastal Area of the Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72** (4); 2373-2378.
- Olesen N.J. and Vestergard Jørgensen PE., (1991).** Rapid detection of viral haemorrhagic septicaemia virus in fish by ELISA. *J. Appl. Ichthyol.*, **7**, 183-186.
- Olesen NJ., Lorenzen N. and Vestergard Jørgensen PE., (1993).** Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Diseases of Aquatic Organisms*, **16**, 163-170.
- Olesen NJ., (1998).** Sanitation of viral haemorrhagic septicaemia (VHS). *J. Appl. Ichthyol.*, **14**, 173-177.
- Önalın Ş., Çağırğan M., Arabacı M., ve Çağırğan H., (2016).** Bakteriyel Balık Patojenlerinin Tanımlanmasında Kullanılan Serolojik Yöntemler. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi*, **1**(3), 77-82.
- Schäperclaus W., (1938).** Die Schädigungen der deutschen Fischerei durch Fischparasiten und Fischkrankheiten. *Allgemeine Fischerei-Zeitung*, **41**, 256-259, 267-270.
- Savigny D. and Voller A., (1980).** The communication of ELISA data from laboratory to clinician. *Journal of Immunoassay*. **1** (1); 105-128.
- Skall HF., Olesen NJ. and Møllergaard S., (2005).** Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming - a review. *Journal of Fish Diseases*. **28**, 509-529.
- Sümbüloğlu K. ve Sümbüloğlu V., (1997).** Mann-Whitney U testi, Biyoistatistik, Hatiboğlu Yayınevi 7. Baskı, Ankara, 269.
- Vestergard Jørgensen PE., (1970).** The survival of viral hemorrhagic septicemia (VHS) virus associated with trout eggs. *Riv. Ital. Piscicol. Ittiopatol.*, **5**, 13-14.
- Way K. and Dixon PE., (1988).** Rapid detection of VHS and IHN viruses by the enzymelinked immunosorbent assay (ELISA). *J. Appl. Ichthyol.*, **4**, 182-189.
- Wolf K., (1988).** Viral Hemorrhagic Septicemia, Fish Viruses and Fish Viral Diseases. Cornell University Press/Ithaca and Landon, 217-249.

Geliş tarihi: 13.01.2017

Kabul tarihi: 13.02.2017

*Başlıca Yazar Yazışma adresi:

Dr. Uğur DEĞİRMENÇİ

Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Bornova, İZMİR

E-mail: ugur.degirmenci@ege.edu.tr