

**ATEŞ YANIKLIĞI ETMENİ [*ERWINIA AMYLOVORA* (BURR.)
WINSLOW ET AL.]'NİN TEŞHİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE
ANTİSERUM HAZIRLANMASI ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR**

Kâzım TÜRKOĞLU¹

Yavuz Emin ÖKTEM²

G İ R İ Ő

Serolojik metodlar fitopatolojide uzun yıllardan beri özellikle bitkilerde hastalık yapan bazı virüslerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Bu metodlar bakteriyolojide de kullanılmağa başlanmış ve kolaylıklar getirmiştir.

Yurdumuzda bu uygulamalar yenidir. Fitopatojen bakterilerin tanımı ile ilgili olmak üzere yapılmış bir çalışmaya ise rastlanmamıştır.

Ateş yakınlığı hastalığı etmeni [*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.]'nin tanımı dış ülkelerde çeşitli serolojik metodlarla yapılmaktadır. Bu hastalığın yurdumuzda bulunup bulunmadığının belirlenmesi Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Organizasyonu (EPPO) tarafından da istenmektedir. Bölge Ziraî Mücadele ve Araştırma Enstitülerinin kendi bölgelerinde bu hastalıkla ilgili survey çalışmaları sonunda elde edilecek izolatlardan hastalık etmeninin daha çabuk ve kesin tanımı için antiserum hazırlanmasının yararlı olacağı düşünülmüştür.

Lelliot (1968), antiserum elde edilmesinde canlı veya 60 °C'de 30 dakika süre ile bekletilmiş *E. amylovora* süspansiyonunun kullanılabileceğini, ilk enjeksiyonun tavşanın dirisi altına (subcutaneous) daha sonraki enjeksiyonlarınsa damara (intravenous) yapılması gerektiğini bildirmektedir. Yazar, enjeksiyonların 21. gününde antibady konsantrasyonu tayini yapılmasını ve konsantrasyon 1/1600'den düşük ise enjeksiyonlara devam edilmesini, 24. günde de istenen konsantrasyon temin edilmediğinde tavşanın değiştirilip yeni bir tavşanda araştırmanın başlatılmasını, çalışmalar sonunda elde edilen antiseruma 1/5000 oranında thiomersalat eklenip buz dolabında saklanmasını önermektedir.

Cruickshank (1965) serolojide kullanılacak tavşanların sağlıklı ve ağırlıklarının 2 kg'dan az olmamasını, enjekte edilecek antijen için seçilen bakterinin bilinen uygun ırklardan biri olmasını bildirmektedir. Yazar, elde edilecek antiseruma % 0.5'lik saf fenol eklenmesi yolu ile buzdolabında + 4°C'de üç yıl kadar saklanabileceğini, koruyucu madde eklenmemesi halinde deep-freez kullanılmasının uygun olacağını, ancak çok uzun yıllar dayanması için freezdrying metodunun uygulanmasını bildirmektedir.

1 Bölge Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü Meyve ve Bağ Hastalıkları Laboratuvarı Şefi — ANKARA

2 Bölge Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü Meyve ve Bağ Hastalıkları Laboratuvarı Başasistanı — ANKARA

MATERYAL VE METOD

Araştırmada Yeni Zelanda tipi, bir yaşlı çiftleşmemiş dişi tavşanlar, antijenin hazırlanmasında ise NCPPB (National Collection Plant Pathogenic Bacteria)'dan sağlanan 595 numaralı *E. amylovora* kültürü kullanılmıştır. Enjeksiyonların yapıldığı tarihler ile deri altı ve damardan enjekte edilen antijen miktarları Cetvel 1'de verilmiştir. Enjeksiyon planı Lelliot (1968)'e göre yapılmış ancak uygulanan antijen miktarları değiştirilmiştir³.

C E T V E L 1

Enjeksiyonların yapıldığı tarihler ile enjekte edilen antijen miktarları

Enjeksiyonların yapıldığı tarih	Enjeksiyon No.	Gün	Uygulama	Antijen	Verilen miktar
5.2.1975	1	0	Derialtına	24 saatlik canlı kültür	1.0 ml
12.2.1975	2	7	Damara	24 saatlik canlı kültür	0.3 ml
15.2.1975	3	10	Damara	24 saatlik canlı kültür	0.6 ml
19.2.1975	4	14	Damara	24 saatlik canlı kültür	1.2 ml
22.2.1975	5	17	Damara	24 saatlik canlı kültür	2.4 ml
26.2.1975	6	21	Kanamama testi	24 saatlik canlı kültür	

Antijenin hazırlanması; 595 numaralı kültür NA (Nutrient Agar)'da uygun sıcaklıkta 24 saat süre ile geliştirilmiştir. Bu süre sonunda gelişen bakteri kolonisinden alınarak steril serum fizyolojik içerisinde süspansiyon haline getirilmiştir. Bu işleme devam edilerek gerekli konsantrasyon sağlandıktan sonra ekjeksiyonlar yapılmıştır.

Enjeksiyonların yapılması; Cetvel 1'de verildiği üzere enjeksiyonlarda başlangıç noktası sıfır kabul edilerek ilk enjeksiyon deri altına, 2. enjeksiyon damara 7. günde, 3. enjeksiyon damara 10. günde, 4. enjeksiyon damara 14. günde, 5. enjeksiyon damara 17. günde Cetveldeki miktarlara göre yapılmıştır.

Kulaktan kan alma ve tüp aglütinasyon metoduyla antibady düzeyinin saptanması; 21. günde enjeksiyon yapılmadan önce tavşanın kulak damarından 10 ml kadar kan alınıp, kanın gerekli seperasyonundan sonra elde edilen anti-serum Cetvel 2'de belirtilen miktarlara göre ayarlanarak antibady konsantrasyonu saptanmıştır.

Altı adet tüpe Cetvel 2'de verilen miktarlar konulduktan sonra 52-54 °C de su banyosunda 2 saat süre ile bekletilmiş ve bu süre sonunda tüplerdeki aglütinasyon gözlenmiştir.

³ Dr. P. W. Sellar'ın 23.12.1974 tarihli mektubunda önerdiği miktarlar verilmiştir.

C E T V E L 2

Tüp aglütinasyonla antibady konsantrasyonunun saptanması

	1	2	3	4	5	Kont- rol
Bakteriyel süspansiyon (Uygun konsantrasyonda)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Antiserum (1/100 oranında serum fizyolojik ile seyreltilmiş)	0.4	0.2	0.1	0.05	0.025	—
Serum fizyolojik	—	0.2	0.3	0.35	0.375	—
Normal serum (1/100 oranında serum fizyolojik ile seyreltilmiş)	—	—	—	—	—	0.4
	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	

S O N U Ç L A R

Antibady konsantrasyonunu saptamak üzere 6. ekjeksiyondan önce alınan kanda yapılan tüp aglütinasyon sonucunda antibady düzeyinin 1/1600 olduğu saptanmıştır. Bu nedenle 6. enjeksiyon yapılmamıştır.

Uygun antibady düzeyinin bulunmasından sonra tavşanın kalbinden kan alınmağa çalışılmış ancak mümkün olmamış, tavşanın boğazındaki arterler kesilip kan steril bir behere toplanmıştır. Bu kan bir gece oda sıcaklığında beklendikten sonra sıvı kısmı alınıp 3000–5000 devirde santrifüj edilmiştir. Antiserumdan bir miktar alınıp 1/10 ve 1/20 oranında sulandırılarak lam aglütinasyon yapılmış ve her ikisinde de kuvvetli bir aglütinasyon görülmüştür. Buna karşılık normal serumla yapılan lam aglütinasyonda hiç bir değişme olmamıştır. Stok antiserum buji kapaklı şişelere konulmuş ve bir kısmının içerisine % 0.5 saf fenol eklenerek buz dolabında, bir kısmı ise koruyucu madde eklenmeden deep-freez'de saklanmıştır.

M Ü N A K A Ş A V E K A N A A T

Çalışmalar sonucunda elde edilen antiserum 1/20 oranında dahi lam aglütinasyonda oldukça kuvvetli aglütinasyon vermiştir. Fenol ilâvesiyle stok antiserumun konsantrasyonunda düşme tesbit edilmemiştir. Alınan sonuçlara göre elde edilen antiserum 1/20'ye kadar sulandırıldıktan sonra lam aglütinasyon metoduyla *E. amylovora*'nın teşhisinde kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

Ö Z E T

Ateş yanıklığı hastalığı etmeni [*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.]'nin tanımı dış ülkelerde çeşitli serolojik metodlarla yapılmaktadır. Bu hastalığın yurdumuzda bulunup bulunmadığının belirlenmesi Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Organizasyonu (EPPO) tarafından istenmektedir. Bu hastalıkla ilgili olarak yapılacak sürveylerde elde edilecek örneklerden yapılacak izolasyonlarda, izolatların çabuk ve kesin tanımını kolaylaştırmak amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

Araştırmada Yeni Zelanda tipi çiftleşmemiş tavşanlar, antijenin hazırlanmasında ise NCPPB (National Collection Plant Pathogenic Bacteria)'dan temin edilen 595 numaralı *E. amylovora* kültürü kullanılmıştır. İlk enjeksiyon deri altına 1 ml olarak enjekte edilmiştir. Diğer enjeksiyonlar ise kulaktan damara uygulanmıştır. Altıncı enjeksiyondan önce 21. günde kulaktan kan alınmış ve antibady konsantrasyonu düzeyinin 1/1600 olduğu bulunmuştur. Uygun konsantrasyonunun saptanmasından sonra 6. enjeksiyon yapılmamış, tavşan kesilerek kan alınmış ve gerekli seperasyon yapılmıştır. Elde edilen stok antiserum 1/20'ye kadar sulandırıldığında dahi lam aglütinasyonda pozitif sonuç vermektedir. Bu stok antiserumun bir kısmının içerisinde % 0.5 oranında saf fenol eklenerek buzdolabında, diğer kısmına ise koruyucu madde eklenmeden küçük şişelerde deep-freeze'de saklanmıştır. Elde edilen antiserumun, etmenin teşhisinde kullanılabilceği kanaatine varılmıştır.

S U M M A R Y

STUDIES ON THE PREPARATION OF ANTISERA FOR IDENTIFICATION OF FIRE BLIGHT CAUSAL ORGANISM [*Erwinia amylovora* (Burr.)

Winslow et al.]

Identification of the causal organism of Fire Blight in foreign countries is done by various serological methods. European and Mediterranean Plant Protection Organisation (EPPO) wants it to be englightened this disease exists in Turkey or not. This serological study, is made in order to control the isolates which will be obtained as a result of survey.

New Zeland virgin rabbits were used for the study. In antigen preparation, No. 595 *E. amylovora* culture, obtained from NCPPB (National Collection Plant Pathogenic Bacteria) was used. The first injection was made subcutaneous and others were intraveneous. On the 21 st day, before the sixth injection, test bleed is made on the ear of the rabbit and, titre of antisera has been obtained by tube agglutination. Titre of antisera was found to be about 1/1600. For this reason no other injections were applied. After the rabbit is sacrificed, the blood is collected in a sterile bottle, left at room temperature for a night and liquid part of it is seperated by centrifuge.

The stock antiserum obtained by this method was added to pure phenol at 0.5 % and kept in the refrigrator.

The remaining part of antisera is kept in small bottles in the deepfreeze without adding any preserving material.

L İ T E R A T Ü R

Cruickshank, R., 1965. Medical Microbiology. A. Guide to the laboratory diagnosis and control of infection. E. and S. Livingstone Limited, Edinburgh and London.

Lelliott, R. A., 1968. The diagnosis of Fireblight (*Erwinia amylovora*) and some disease caused by *Pseudomonas syringae*, 1 Report of the international conference on fireblight. European and Mediterranean Plant Protection Organisation. EPPO Publications Series A. No 45 E Paris.