

*A.Ü. ve İ.Ü. Veteriner Fakülteleri, Bakteriyoloji ve Salgınlar Kürsüleri
Prof. Dr. Hasan Başkaya ve Prof. Dr. Muzaffer Beşe*

YURDUMUZDA İZOLE EDİLEN M. capri SUŞLARININ ÜREME-İNHİBİSYON VE AGAR-JEL DİFFUSYON TEKNİKLERİ İLE ANTİJENİK ANALİZLERİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Mustafa Arda*

Muzaffer Beşe**

Investigations, Using Growth-Inhibition and Agar-gel Diffusion Techniques, on the Antigenic Structure of Mycoplasma capri Strains Isolated in Turkey

Summary: In this study, 9 M. capri strains isolated from several parts of Turkey were used. According to the results of the experiment, it was understood that there were no antigenic differences between isolates. All hyperimmune sera were reacted with homolog and heterolog antigens both in the growth-inhibition and agar-gel diffusion tests.

Özet: Bu çalışmada, yurdumuzun çeşitli yörelerinden izole edilmiş 9 M. capri suşu kullanıldı. Araştırmanın sonuçlarına göre, suşlar arasında antijenik bir ayrılık saptanamadı. Bütün hiperimmün serumlar, homolog ve heterolog antijenler ile, hem üreme-inhibisyon ve hem de agar-jel diffüzyon testlerinde reaksiyon verdiler.

Giriş

Pleuropneumonia-Like Organizmalar (PPLO), çok değişik karakterleri nedeniyle, birbirlerinden ayrımları güçlükler göstermektedir. Her ne kadar morfolojik, kültürel, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinde bazı farklar görülmüşse de, bunlardan yararlanarak bir klasifikasyon mümkün olamamaktadır. Ayrıca, bu belirtilen özellikler de her zaman sabit değildir. Kullanılan besi yerlerinin kalitesi, bileşimi ve üretme koşulları, bu mikroorganizmaların morfolojik ve kültürel karakterlerinde bazı değişmeler yapabilmektedir (9,15,16,17).

* A.Ü. Vet. Fak. Bakteriyoloji ve Salgınlar Kürsüsü Profesörü, Ankara, Türkiye.

** İ.Ü. Vet. Fak. Mikrobiyoloji Kürsüsü, Profesörü, İstanbul, Türkiye.

Ayrı orijinden izole edilen mikoplazmaların (PPLO) antijenik özelliklerini saptamak amacı ile bir çok serolojik testler uygulanmıştır. Aglutinasyon tekniği ile suşlar arasındaki antijenik ilişkiler araştırmacılar tarafından incelenmiştir (1,3,6,7,9,13,15,16). Bunun dışında güvenilir bir test olan komplement-fiksasyon reaksiyonu (3,7,10,13,14) ve üreme-inhibisyon testleri de (1,4,6,7,8,13,17) aynı amaçla kullanılmıştır. Bu bildirilen serolojik testler yanısıra, PPLO'lar arasında antijenik ilişkiyi açıklamada, son yıllarda, ya tek yada diğer testlerle birlikte agar-jel difüzyon tekniğinden de yararlar sağlanmaktadır (1,9,11,13,14).

Yurdumuzda, keçilerin Salgın Ciğerağrısı enfeksiyonlarından izole edilmiş suşların, antijenik özelliklerini ve ilişkilerini incelemek amacı ile bazı serolojik testler uygulanmıştır. Bunların başında aglutinasyon (3,6) ve komplement-fiksasyon (3) reaksiyonları gelmektedir. Ayrıca, disk metodu ile uygulanan üreme-inhibisyon testi de (6) yukardakilerine bir katkıda bulunmaktadır. Ancak yapılan bu serolojik metodlarla yurdumuzda izole edilen M. capri suşları arasında antijenik yönden bir ayırım bulunamamıştır. Suşlar kros-reaksiyonlarda pozitif olarak çalışmışlardır.

Bu araştırma, yurdumuzun çeşitli yörelerinden izole edilen M. capri suşları arasında, agar-jel difüzyon ve sıvı ortamda uygulanan üreme-inhibisyon testleri ile, bir yakınlığın veya ayrılığın varlığını saptamak amacıyla, ele alınmıştır.

Materyal-Metod

1- **Suşlar:** Bu çalışmada kullanılan 9 M. capri suşu (7,7-1, 23S, 32K, 41,62K, 65, 80A, 142) yurdumuzun değişik yerlerinde seyreden Bulaşıcı Keçi Ciğer Ağrısı olaylarından izole edilmiştir.

Suşların morfolojik, kültürel ve biyokimyasal özellikleri incelenerek, VF-agarında üreyen tipik kolonilerden elde edilen kültürler çalışmada kullanılmıştır.

2- **Besiyerleri:** Suşların üretilmesinde, antijenlerin hazırlanmasında ve üreme-inhibisyon testlerinde Viande-Foie (VF) boyyonu kullanılmıştır (2). VF- boyyonu ve agarına % 20 steril at serumu + 1000 Ü.İ. / cc. penicilline + 1/8000 Thallium acetate katılmıştır. Ayrıca % 10 defibrine koyun kanlı VF-agarından da yararlanılmıştır.

3- Antijenlerin hazırlanması:

a- *İmmunizasyon antijeni*: M. capri suşlarının herbiri ayrı ayrı 3 er litre VF-buyyonuna ekilerek, 37° C.lik rutubetli etüvde çalkalama cihazı üzerine yerleştirildi ve alet dakikada 20 devire ayarlandı. Kültürlerin 36-40 saatlik inkubasyonundan sonra, herbirinden kontaminasyon kontrolü yapıldı ve uygun olanlar, Sharples santrafütü yardımı ile toplandılar. Mikrop suspansiyonları steril fizyolojik su ile 3 defa yıkandıktan sonra, yoğunlukları, bufferlı fiz. su ile Mc. Farland No. 1 nefelometresinin 50 katına ayarlandı, Antijenler, 10 cc. miktarlarında tüplere taksim edilerek -20° C. de muhafaza edildiler.

b- *Diffüzyon antijeni*: Aynı koşullarda üretilen, toplanan ve yıkanan M. capri antijenleri üzerine son santrafütünden sonra 10 cc. steril tridistile su kondu ve iyice karıştırılarak -20°C. de tutuldular. Antijenlerin herbiri 10 defa dondurulup-çözöldükten sonra bir defa da, Omni mikser (Serval) cihazında soğukta parçalandılar. Antijenler kullanılacağı zaman, 800 devirle 2 dakika santrafütüje edildiler ve üst taraf kapillar pipetle alınarak denemeye iştirak ettirildiler.

4- **Hiperimmün serum hazırlanması**: İmmunizasyon antijenleri, ayrı ayrı, orta boyda ve sıhhatli ikişer tavşana, intra venöz yolla, haftada iki defa olmak ve 8 hafta devam etmek üzere, 1 cc. miktarında şırınga edildi.

Ayrıca iki adet tavşana da, kontrol amacı ile, aynı süre ve miktarda, sadece VF-buyyonu verildi.

Son şırıngadan bir hafta sonra, tavşanların kalbinden kan alınarak serumları çıkarıldı ve sterilite kontrolleri yapılarak, kullanıncaya kadar -20°C. de muhafaza edildiler.

5- **Diffüzyon ortamı**: Bu denemede diffüzyon ortamı olarak, çift distile su ile hazırlanmış Veronal buffer (pH. 7.2) + Difco pürifiye agar (% 1.25) + Merthiolet 1/10000 kullanılmıştır.

Ayrıca, ortama, Protamine sulfat 0.1 mg./cc. katılmıştır (5).

Eritilmiş diffüzyon ortamı 7 cm. çapındaki petri kutularına, 7-8 mm. kalınlık yapacak tarzda döküldü. Katılaştıktan sonra, biri ortada ve diğer 5 tanesi de yanlarda olmak üzere 7 mm. çapında ve orta delikten uzaklıkları 5 mm. olan toplam 6 delik açıldı. Bunların dipleri, bir damla erimiş diffüzyon ortamı ile kapatıldıktan sonra sonra bir gece etüvde kurumaya bırakıldı.

6- Diffusyon tekniği: Kapillar pipet yardımı ile ortadaki çukura hiperimmün serum, yanlardakine ise homolog ve heterolog antijenler kondu. Petri kutuları 3 saat etüvde tutulduktan sonra, tekrar, serum ve antijenlere ilâveler yapıldı. Bundan sonra, 5 gün süre için rutubetli etüve yerleştirildiler (12).

Petri kutuları hergün sabah ve akşam presipitasyon çizgisi yönünden kontrol edildiler. Kontrol serum ayrı bir petri kutusunda antijenlerle reaksiyona iştirak ettirildi ve aynı işlemler uygulandı.

İmmün serumların titrelerinin tayininde, serumlar iki katlı sulandırılarak (1/1,1/2,1/4,1/8,1/16) yanlardaki deliklere ve homolog antijenler de ortadaki deliğe konuldular.

7- Üreme-inhibisyon testi: Bu uygulama, VF-buyyonunda yapılmıştır (17). İmmün serumlar VF-buyyonu içinde 1/20 oranında sulandırıldı ve tüplere 2 cc. miktarında dağıtıldı. M. capri suşlarının 24 saat lik buyyon kültürlerinden ayrı ayrı, 0,05 cc. miktarında alınarak immün serumlu tüplere ekildi. Kontrol olarak ta iki adet normal serum ihtiva eden VF-buyyonu kullanıldı. Ekimden sonra, bütün tüpler iyice karıştırıldılar ve 37°C. lik etüve 5 gün süre ile konuldular. Tüplerdeki üremeler, kontrol tüple karşılaştırarak, gözle değerlendirildi. Bu sürenin sonunda, ayrıca, her tüpten 0.05 cc. alınarak VF-agarına ekimler uygulandı ve üreme durumu 5 gün sonra diseksiyon mikroskobu altında sayılarak değerlendirildi. Kontrol agardaki koloni sayısından % 50 noksan koloni ihtiva eden petri kutularında. üreme-inhibisyon pozitif (+), kontrole yakın koloni sayısı ise negatif (-) kabul edildi. Kontrolde daha az sayıda, küçük, düzensiz, granüllü ve ayrımı güç koloni ihtiva eden petri kutuları da üreme-inhibisyon şüpheli (±) olarak değerlendirildiler (2).

Bu çalışmada kullanılan diffusyon ortamı, delik çapları, uzaklıkları, agar konsantrasyonları ve inkubasyon ısısı bir ön çalışmanın sonuçlarından yararlanılarak elde edilmiştir. Bu ön denemede, çeşitli agar türleri (Difco special agar-Noble, Difco purified agar) ve konsantrasyonları (% 1; % 1.25; % 1.5; % 1.75; % 2.0), çukurların çapları (3-5-7 mm.) yanlardaki çukurların ortadakine uzaklıkları (3-5-7-10 mm.) ve çeşitli ısı dereceleri (+ 4°C. ; + 22°C. ; + 37°C.) ayrıntılı olarak kontrol edildi. Ayrıca, ortamın pH. sı (7.0-7.2-7.4) ve Veronal buffer ile fizyolojik su da incelenmiştir.

Sonuçlar

1- Agar-jel diffusyon sonuçları: Denememizde 9 immün tavşan serumu homolog ve heterolog antijenler ile katı ortamda çift

diffusyona tabi tutuldu. Ortadaki serum çukurları ile yanlardaki antijen çukurları arasındaki bölgede, 24 saatten önce başlayan ve anti-kor çukurlarına daha yakın tek ve az belirgin presipitasyon çizgileri görüldü. Bu çizgiler zamanla daha belirginleşti ve uçlarından birbirlerine birleştiler. İkinci günden sonra da yanlardaki çukurlara daha yakın ve eğri çizgiler oluşmaya başladı. Bunlar 5 inci günde daha iyi görülür hale geldiler. Fakat bunlar kavisli olduklarından birbirleriyle birleşmediler.

Kontrol serumla, antijenler arasında 5 günlük bir inkubasyon süresinin sonunda herhangi bir persipitasyon çizgisi teşekkül etmedi.

Bütün hiperimmün serumlar, homolog ve heterolog antijenlerle çift presipitasyon çizgisi oluşturdular. Suşlar arasında herhangi bir ayrıcalık saptanamadı. Alınan sonuçlar aşağıdaki çizelge 1 de gösterilmiştir:

Hiperimmün serumlar	Antijenler								
	7	7-1	23S	32K	41	62K	65	80A	142
7	2*	2	2	2	2	2	2	2	2
7-1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
23S	2	2	2	2	2	2	2	2	2
32K	2	2	2	2	2	2	2	2	2
41	2	2	2	2	2	2	2	2	2
62K	2	2	2	2	2	2	2	2	2
65	2	2	2	2	2	2	2	2	2
80A	2	2	2	2	2	2	2	2	2
142	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Kontrol serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(*): Rakamlar presipitasyon çizgi sayısını göstermektedir.

Hiperimmün serumların kendi homolog antijenleri ile yapılan titreleri sonunda, serumlar, 1/8 oranına kadar çalışmış ve 1/16 da ise herhangi bir presipitasyon çizgisi izlenememiştir. Serumların 1/1 ve 1/2 oranındaki dilisyonlarında çift çizgi buna karşılık 1/4 ve 1/8 sulandırılmalarında ise tek çizgi oluşmuştur. Sadece, 142 No'lu serumun 1/16 dilisyonunda çok az belirgin bir çizgi meydana gelmiştir.

Denemede, ortama katılan Protamine sulfat'ın etkisi zayıf bulunmuştur. Presipitasyon çizgisinin belirgin ve erken görülmesi üzerine en fazla inkubasyon ısısı, delik çapı ve yanlardaki deliklerin ortadake uzaklığı ve agar konsentrasyonları etkilemektedir. Ortamın berrak olması sonucu değerlendirmek bakımından önemlidir. Kul-

lanılan iki agar türü ve Veronal buffer ile fizyolojik su aynı etkinlikte bulduklarından bunlardan biri tercih edilmiştir (ön çalışmalara göre).

2- Üreme-inhibisyon sonuçları: Bu testte, immun serumlar homolog ve heterolog suşların üremelerine mani olmuş veya üremelerini inhibe etmiştir. Kontrol serumlu buyyonlarda bol üreme görmüştür. Sonuçlar gözle değerlendirilmiştir. Ayrıca her tüpten alınan 0.05 cc. miktarı VF-agarına ekildi ve inkubasyon süresi sonunda immun serum ihtiva eden buyyonlardan yapılan ekimler, üreme-inhibisyon pozitif olarak bulunmuştur.

Üreme-inhibisyon testinin sonuçlarına göre, *M. capri* suşları arasında bir ayırım tesbit edilememiştir. Sonuçlar aşağıdaki çizelge 2 de gösterilmiştir:

Hiperimmün serumlar	S u ş l a r								
	7	7-1	23S	32K	41	62K	65	80A	142
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32K	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62K	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
142	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrol serum	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(-): Üreme - inhibisyon pozitif, (+): Üreme-inhibisyon negatif

Tartışma

Pleuropneumonia-Like Organizmaları (PPLO) ayırmda kültürel ve biyokimyasal testler genellikle yetersiz kalmaktadır. Çeşitli orijinli mikoplasmalar, karşılıklı olarak, bu yönleriyle benzerlikler göstermektedirler. Bu nedenle, kültürel ve biyokimyasal testlere dayanılarak yapılacak klasifikasyon güven verici olmaktan uzaktır (9, 15).

Orijinleri ayrı mikoplasmaları, birbirinden ayırmada, hali-hazırda, serolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Ancak, bunlar da patojenik olanlarla olmayanları ayırmda iyi sonuçlar vermesine karşılık (9), patojen olanlar arasında ayırım bakımından bazı sakıncalar saptanmış bulunmaktadır. Nitekim, sığır orijinli bir suş (*M. mycoides*) serolojik olarak, keçi orijinli olanla (*M. capri*) ortak anti-

jenik komponentlere sahip olduğu araştırıcılar tarafından açıklanmıştır (9,11). Fakat, buna karşılık ayrı fikirde olanlar da bulunmaktadırdır (10).

Yurdumuzda Keçilerin Salgın Ciğerağrısı olaylarından izole edilen *M. capri* suşları arasında uygulanan aglutinasyon (1,3,6), komplement-fiksasyon (3) ve disk metodu ile yapılan üreme-inhibisyon reaksiyonları (6) ile herhangi bir antijenik ayrılık saptanamamıştır.

Yaptığımız çalışmada, gerek agar-jel diffüzyon ve gerekse sıvı ortamda uygulanan üreme-inhibisyon testlerinde, kullanılan 9 *M. capri* suşları arasında, antijenik yönden, herhangi bir ayrılık tesbit edilememiştir. Bu nedenle, elde edilen sonuçlar, araştırıcıların diğerdifer serolojik tekniklerle bulduklarıyla bir benzerlik göstermektedir.

Denemeye iştirak ettirilen Protamin sulfat'ın diffüzyon üzerine olumlu etkisi, enteroviruslarla yapılan çalışmadaki kadar bulunamamıştır (5).

Presipitasyon çizgisinin erken ve belirgin oluşmasına, inkubasyon ısısının, çukur çapının, yandaki çukurların ortaya uzaklığının ve agar konsantrasyonunun rolü büyük olmuştur. Ortamın berrak olması reaksiyonu okuma bakımından önemlidir. Ortamın pH.sının etkisi pek saptanamamıştır.

Literatür

- 1- **Arda, M.** (1968): *Keçi ve kanatlı orijinli Pleuropneumonia-Like Organizmaların genel karakterleri ile, üreme-inhibisyon, presipitasyon aglutinasyon ve indirek hemaglutinasyonla idantifikasyonları*. Ank. Üniv. Vet. Fak. Yayınları 229; Çalışmalar No. 131.
- 2- **Barber, T.L. and Fabricant, J.** (1962): *Primary Isolation of Mycoplasma Organisms (PPLO) from Mammalian Sources*. J. Bact., 83: 1268-1273.
- 3- **Beşe, M.** (1963): *Keçi Ciğerağrısı hastalık etkeninin (*M. mycoides* var. *capri*) izolasyonu, biyolojik, biyoşimik ve serolojik özellikleri*. Ank. Üniv. Vet. Fak. Yayınları, 155; Çalışmalar No. 93.
- 4- **Clyde, W.A.** (1964): *Mycoplasma species identification based upon growth-inhibition by spesific antisera*. J. Immunol., 92: 958-965.
- 5- **Conant, R.M. and Barron, A.L.** (1967): *Enhanced diffusion of enterovirus antigens in agar-gel in the presence of protamine*. Virology, 33: 547-549.

- 6- **Cottew, G.S., Watson, W.A., Erdağ, O. and Arısoy, F.** (1969): *Mycoplasma of caprine Pleuropneumonia in Turkey and their relationship to other mycoplasmas of goats and M. mycoides var. capri.* J. Comp. path., 79: 541-551.
- 7- **Edwards, D.G.** (1963): *Organisms of the Pleuropneumonia group causing disease in goats.* Vet. Rec., 65: 873-875.
- 8- **Edwards, D.G. and Fitzgerald, W.A.** (1954): *Inhibition of growth of PPLO by antibody.* J. Path. Bact., 68: 23-30.
- 9- **El Nasri, M.** (1967): *Mycoplasmas from Contagious Caprine Pleuropneumonia.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 143: 298-304.
- 10- **Hudson, J.R., Cottew, G.S. and Adler, H.E.** (1967): *Diseases of goats caused by Mycoplasma: A Review of the subject with some new findings.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 143: 287-297.
- 11- **Lemcke, R.M.** (1965): *A Serological Comparison of various species of Mycoplasma by an Agar-Gel Double diffusion Technique.* J. Gen. Microbiol., 38: 91-100.
- 12- **Ouchterlony, Ö.** (1964): *Gel-Diffusion Techniques.* Alınmıştır. Ackroyd, J.F. (1964): *Immunological Methods.* Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 55-78.
- 13- **Provost, A., Villemot, J.M., Queval, R. et Borredon, C.** (1964): *Recherches Immunologiques sur la péripneumonie. IX. Données nouvelles sur les relations antigéniques de Mycoplasma mycoides avec d'autres Mycoplasmataceae.* Rev. Elev. Med. Vet. Pays trop., 17: 23-33.
- 14- **Taylor-Robinson, D., Somerson, N.L., Turner, H.C. and Chanock, R.M.** (1963): *Serological Relationships Among Human Mycoplasmas as Shown by Complement-Fixation and Agar Gel Diffusion.* J. Bact., 85: 1261-1273.
- 15- **Tourtellotte, M.E. and Jacobs, R.E.** (1960): *Physiological and Serologic Comparisons of PPLO from various sources.* Ann. N.Y. Acad. Sci., 79: 521-530.
- 16- **Yamamoto, R. and Adler, H.E.** (1968): *Characterization of Pleuro-pneumonia-Like Organisms of Avian Origin. I. Antigenic Analysis of seven strains and their comparative pathogenicity for bird.* J. Infec. Dis. 102: 143-152.
- 17- **Yamamoto, R. and Adler, H.E.** (1968): *Characterization of Pleuropneumonia-Like Organisms of Avian Origin. II. Cultural, biochemical, morphological and further serological studies.* J. Infec. Dis., 102: 243-250.

Yazı "Dergi Yazı Kuruluna" 25.4.1974 günü gelmiştir.