

Bitki Virüslerinin Tanılanmasında Kullanılan Serolojik Yöntemler

Semih Erkan¹, Mustafa Gümüş², İsmail Can Paylan³, H. Murat Sipahioğlu⁴

Özet

Virüsler dünyada çok sayıda tarımsal bitkide önemli düzeyde ürün kayıplarına neden olmaktadır. Bitkilerdeki diğer patojenlerin aksine, virüsleri kontrol etmek için kullanılan doğrudan mücadele yöntemleri mevcut değildir. Ayrıca, virüs hastalıklarının kontrolünde yararlanılan önlemlerin çoğu bitkileri tedaviden ziyade korumayı temel aldığından, virüs hastalıklarının yönetiminde patojenin tanısı için güvenilir ve duyarlı yöntemlere ya da tekniklere sahip olmak önemlidir. Virüslerin teşhisinde kullanılan yöntemler, virüs ile onun konukçusu ve/veya vektörü arasındaki etkileşim ile ilişkili biyolojik özellikler ve virüsün kendi bileşenlerine (kılıf proteini ve nükleik asit) ait özellikler olmak üzere iki ana kategoride ele alınmaktadır. Kılıf proteini temelli tanılama yöntemleri arasında presipitasyon veya agglutinasyon testleri, enzim, radyoaktif veya floresans maddeler gibi markırların kullanıldığı immunosorbent deneyler, immunoblotlama ve İmmunosorbent elektron mikroskopi yer almaktadır. Viral kökenli hastalıkların teşhisinde serolojik testlerin ana avantajları özgül, hızlı, duyarlı ve güvenilir olmalarıdır. Serolojik testlerden hastalık teşhisi, survey, araştırma, bitki karantinası, sertifikasyon ve ıslah amaçları için uzun yıllardır yararlanılmaktadır. Son yıllarda bitki virüslerinin spesifik ve hızlı tanısı için değişik serolojik yöntemler geliştirilmiştir. Bu makalede, bitki virüslerinin teşhis ve tanısında yaygın olarak kullanılan serolojik testlerin çeşitleri, prensipleri ve uygulanmaları konusundaki bilgiler karşılaştırmalı bir biçimde sunulmaktadır.

GİRİŞ

Günümüzde bitkilerde 1000'e yakın sayıda virüsün bulunduğu ve bunların bitkilerde gelişme, ürün oluşması, oluşan üründe kalite ve pazarlama değeri gibi önemli kriterler üzerine doğrudan veya dolaylı olarak etki yaptığı bilinmektedir (1). Konukçu-virüs kombinasyonuna bağımlı olarak, virüslerin değişik ülkelerde yıl bazında milyonlarca ifade edilen sayıda bitkinin ölümüne veya milyar dolarlarla nitelenen miktarda ürün eksilişine neden oldukları açıklanmaktadır (1). Bitkilerde hastalık oluşturan diğer patojenlerin aksine, virüsleri kontrol etmek amacıyla kullanılan doğrudan mücadele yöntemleri ve araçları henüz mevcut değildir. Bitkilerdeki virüs hastalıklarına karşı genel olarak;

¹ Prof. Dr., ² Doç. Dr., ³ Araş.Gör. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 35100 Bornova İzmir. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi : semih.erk@ege.edu.tr ⁴Doç. Dr., Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 65080 Van.

- Virüslerin bitkilere bulaşmasını önlemek için enfeksiyon kaynağının ortadan kaldırılması,
- Vektörlerle mücadele ederek hastalık yayılımının azaltılması,
- Virüsten ari bitki materyalinin kullanılması,
- Virüslere dayanıklı çeşitlerin kullanılması

gibi önlemler alınmaktadır. Görüldüğü üzere, bitkilerde hastalık yapan virüslerle mücadelede dolaylı olarak yararlanılan yöntemler ya da taktikler ele alınmakta ve burada bitkilerin virüs enfeksiyonundan korunmaları amaçlanmaktadır. Bu nedenle, bitki virüs hastalıklarının yönetiminde bitkilerde ve vektörlerde virüslerin teşhisi ve tanısı önemli bir role sahiptir. Bitki virüsleri için kullanılan tanılama teknikleri genel olarak iki başlık altında toplanmaktadır (2):

- Virüs ile konukçu ve/veya vektörü arasındaki etkileşime (interaksiyona) bağlı biyolojik özellikler (örneğin simptomatoloji, biyolojik endeksleme ve taşınma testleri)
- Virüsün kendi bileşenlerine (protein ve nükleik asit) ait özellikler (örneğin presipitasyon, aglütinasyon testleri, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), immunoblotlama testi, hibridizasyon testi, polimeraz zincir reaksiyonu, elektron mikroskobu)

Bu bilgiler ışığında; bitkilerdeki virüslerin teşhis ya da tanısında kullanılan yöntem veya teknikleri, *simptomatoloji, biyolojik endeksleme, taşınma testleri, seroloji, nükleik asit temelli yöntemler ve elektron mikroskopi* gibi ana başlıklar altında ifade etmek mümkündür. Bitkilerde virüslerin teşhisi ve tanısı genel olarak araştırma, mücadele ve hastalık yönetimi, virüsleri gruplandırma, virüs ırklarını saptama, epidemiyolojik çalışmalar, karantina, tohum-fide ve fidan sertifikasyonu, surveyler, ıslah vb. amaçlar için yapılmaktadır (3).

Kullanılan yöntem ve tekniklerin güvenli, özgül (spesifik), duyarlı, hızlı ve ekonomik olması istenilen özellikler arasındadır. Bitki virüslerinin teşhisi ve tanısında virüslere bağımlı olarak bir yöntem ya da tekniğin kullanılması yeterli olabileceği gibi, bazen kesin sonuca ulaşmak için birden fazla yöntem veya teknikten birlikte yararlanmak gerekebilmektedir.

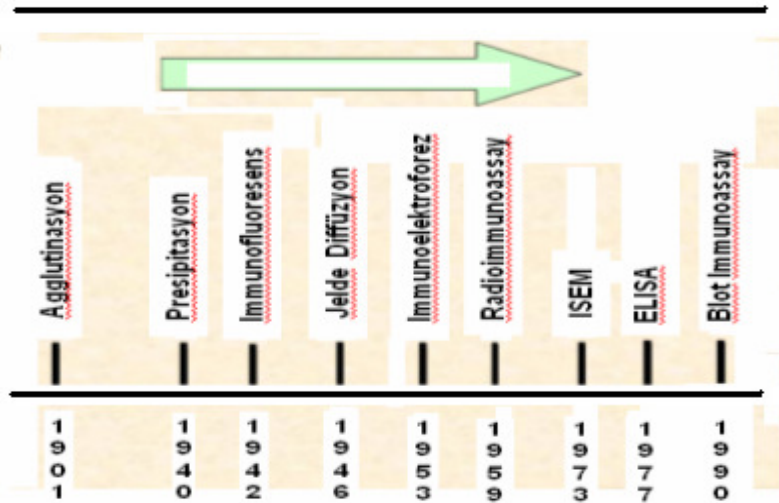
SEROLOJİ VE BİTKİ VİRÜSLERİNİN TANILANMASINDA KULLANILAN SEROLOJİK YÖNTEMLER

Bitki virüslerinin tanılanması ve teşhisinin yanında, yürütülen değişik amaçlı araştırmalarda da serolojik yöntemlerden uzun yıllardır başarılı bir şekilde yararlanılmaktadır. Virüs hastalıklarının kesin tanısı ve teşhisi için, diğer patojenlerde olduğu gibi etmeni göstermek, üretmek, ortaya çıkarmak güç olmakta ve her zaman mümkün olamamaktadır. Serolojik yöntemler virüslerin nükleik asitlerini çevreleyen kılıf ya da membran proteinlerine ve onların özelliklerine dayalı olarak yapılmaktadır. Serolojik yöntemlerde immunolojideki antijen ile antikor arasındaki ilişkiler temel alınmaktadır.

Antijen-antikor arasındaki ilişkiler organizmaları enfeksiyonlara karşı koruyucu özellik görevini üstlenmelerinin yanında, virüslerin in vitro'da tanılanmasında da yardımcı olmaktadır. Antijen-antikor bağlanması ile ilgili in vitro yapılan deneylerde, antikorlar içinde buldukları serumlarla kullanıldıkları için bu konudaki reaksiyonlar *serolojik olaylar* ve bunlarla ilgilenen bilim dalı ise *seroloji* olarak isimlendirilmektedir. Bazı

araştırıcılar ise, serolojiyi “bağışıklık serumlarının incelenmesi ve patojenleri, molekülleri, antijenleri vb. teşhis etmek ya da tanılmak üzere antiserumların kullanılmasını inceleyen immünolojinin bir alt dalı” olarak tanımlamaktadır (1, 4). Serolojide antijen ve antikor temel kavramlardır. Antijen ile antikorun birleşmesi kimyasal bir olaydır ve bu birleşmede kovalent olmayan bağlar (hidrojen, iyonik, van der Waals ve hidrofobik bağlar) rol oynamaktadır. Antijen molekülünün yüzeyinde çıkıntı şeklinde bazı kimyasal yapılar bulunmaktadır. Antijenin kendine özgü antikorlarla birleşmesini sağlayan bu yapılar *epitop (determinant grup=antijenik belirleyici)* adı verilmektedir. Bir antijen molekülünde aynı veya farklı yapıda çok sayıda epitop bulunabilir. Epitop sayısı antijenin molekül büyüklüğü ve karmaşıklığı ile yakından ilgilidir. Bu nedenle, bir antijen molekülü birden fazla sayıda antijen özgüllüğü gösterebilmekte ve farklı yapıdaki her epitop kendine özgül antikorlarla ayrı ayrı birleşebilmektedir. Antijen yüzeyindeki epitop ile özgül antikorun bağlanma yeri arasındaki ilişki anahtar ile kilit arasındaki uyuma benzemektedir ve bu iki molekül arasındaki birleşmenin düzeyi moleküllerin özelliklerine bağlı olmaktadır. Uyum ve çekim gücü yüksek ise moleküller daha hızlı ve sağlam bir biçimde birleşmekte ve çözünmeleri ise çok yavaş olmaktadır (5).

Bitkilerdeki virüs enfeksiyonlarının belirlenmesinde serolojik yöntemlerden eskiden beri yararlanılmaktadır ve bir kısım modifikasyonlar yapılarak günümüzde de kullanılmaya devam edilmektedir ((1, 2, 4-7). Bu yöntemlerle (şekil 1), elde bilinen özgül antikorları içeren antiserumun bulunması durumunda bilinmeyen antijenlerin (virüslerin) tanınması yapılmakta ya da elde bilinen antijenlerin olması halinde ise antiserumda bu antijene karşı özgül antikor bulunup bulunmadığı anlaşılabilmektedir.



şekil 1. Serolojik testlerin tarihsel gelişimi

Bitkilerdeki virüslerin tanınması amacıyla kullanılan serolojik yöntemler ya da teknikleri aşağıdaki gibi sınıflandırmak mümkündür (1, 2, 4-8):

- Presipitasyon (Çökeltme) Testleri
 - Tüpte Halka Testi
 - Tüpte Presipitasyon Testi
 - Mikropresipitasyon Testi
 - Jelde Presipitasyon Testleri
 - İmmunoelektroforez Testi

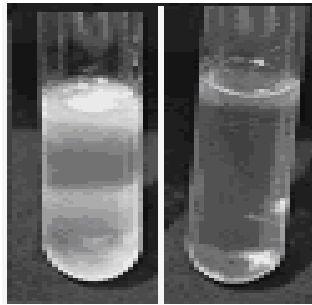
- Aglütinasyon Testi
- Radyo Aktif Madde, Enzim ve Floresans Boya Aracılığı İle Yapılan Testler
 - Radioimmunoassay (RAI)
 - Immunofluorescence (IFA)
 - Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)
- Immunosorbent Elektron Mikroskopi (ISEM)

PRESİPİTASYON (ÇÖKELME) TESTLERİ

Virüslerin serolojik yönden incelenmelerinde çok eski tarihlerden bu yana kullanılan yöntemlerdir. Bu test suda çözünen antijenlerin kendilerine özgü olan antikorlarla birleşerek antijen+antikor komplekslerini meydana getirmeleri temeline dayalıdır. Bu testlerin sonucunda, deney ortamında önce bir bulanıklık ve daha sonra ise halka, daire, bant, çizgi vb. şekillerde çökeltme olduğu görülmektedir. Çökeltme olayına *presipitasyon* ve oluşan çökeltiye ise *presipitat* adı verilmektedir. Bu testlerde reaksiyonun oluşmasında antijen ve antikor miktarları etkilidir. Çökeltme reaksiyonunun ortaya çıkması bu iki molekülün oransal miktarları ile yakından ilişkilidir. Antikorlar iki valanslı, antijenler ise çok değerlikli moleküllerdir. Ortamda fazla miktarda antikorum bulunması, antikorların yalnızca bir antijen molekülüne bağlanarak tek değerlikli moleküller gibi davranmasına yol açmakta ve çökelti oluşumu engellenebilmektedir. Antijenlerin fazla olması durumu da antijen-antikor bağlanmasını etkilemekte ve antijenlerin tek değerlikli moleküller olarak iş yapmasına neden olmaktadır. Her iki durumda çökeltmenin gözlenememesi mümkün olmaktadır.

Presipitasyon testleri değişik şekillerde uygulanmaktadır:

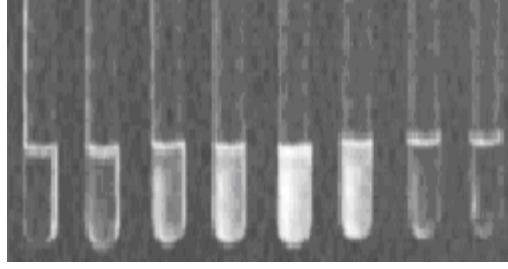
- Tüpte Halka (Ring) Testi: Antiserumda bilinen bir antijene karşı özgül antikor olup olmadığını ya da bilinen bir antikora karşı antijenin varlığını ortaya koymak amacıyla uygulanan basit bir testtir. Test için küçük tüplere konulan antiserum üzerine tabaka oluşturacak şekilde ve artan oranlarda antijen eklenmektedir. Kısa süreli bir inkübasyondan sonra, antikor ile antijenin temas ettikleri yerde halka şeklinde bir çökelti oluşması mevcut ise (Şekil 2), sonuç olumlu olarak değerlendirilmektedir (6, 8, 9).



Şekil 2. Tüpte halka testi sonucunda gözlenen reaksiyon

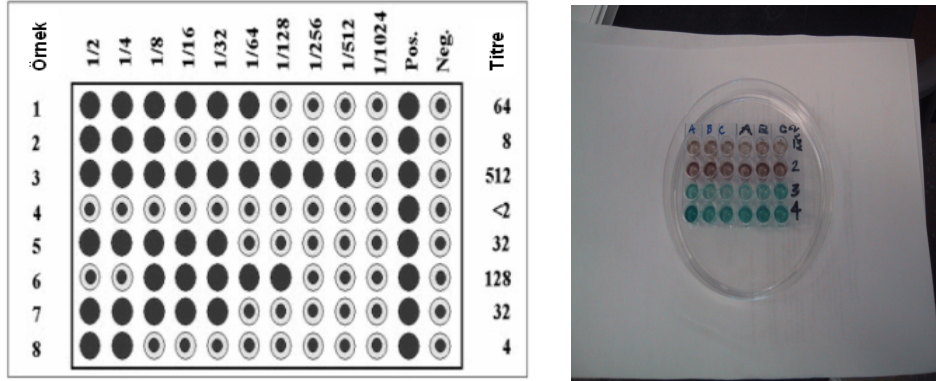
- Tüpte Presipitasyon Testi: Bir ölçüde kantitatif özellik taşıyan bu test antiserumun titresini ve antijenin konsantrasyonunu araştırmak için tüp içinde uygulan eski yöntemlerden birisidir. Bir seri tüpe konulan belli miktardaki antikor içeren antiserum üzerine, değişik miktarlarda antijen yerleştirilerek karıştırılmakta ve tüpler belirli bir süre 37 °C'de inkübasyona bırakılmaktadır. Tüplerde azdan başlayarak gittikçe artan ve sonradan azalarak kaybolan bir bulanıklık olduğu görülmektedir (Şekil 3). Bulanıklık ve çökeltmenin en yüksek düzeyde olduğu tüpte antijen-antikor oranı

birbirine eşittir ve bu durum reaksiyona giren moleküllerin titre ve konsantrasyonunu belirlemeye yardımcı olmaktadır (4, 6).



Şekil 3. Tüpte presipitasyon testi ve gözlenen reaksiyonlar

- Mikropresipitasyon Testi: Bu testte antiserum ve antikor içeren antiserum petri kabı ya da lam üzerine eşit miktarlarda ve damlalar halinde konmakta, damlalar karıştırılmakta ve karışım kısa süreli bir inkübasyona bırakılmaktadır (4, 8, 9). Daha sonra, oluşan çökelti binoküler ile incelenmekte ve değerlendirme yapılmaktadır (Şekil 4).

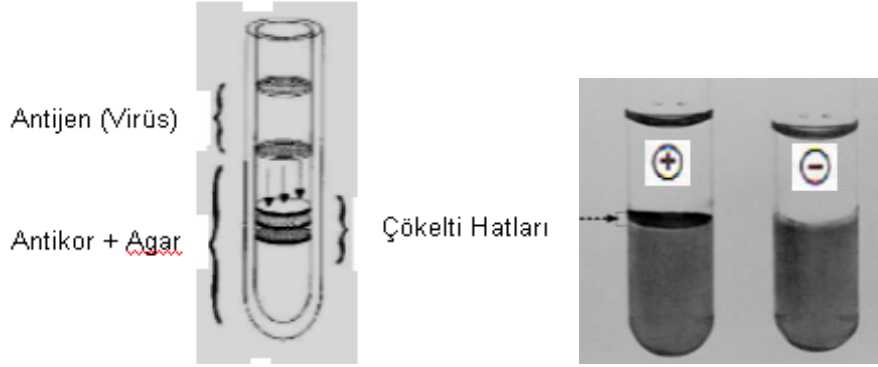


Şekil 4. Mikropresipitasyon testi ve gözlenen reaksiyonlar (4)

- Jelde Presipitasyon Testleri: Bu testler genellikle tüp ya da petri kabı kullanılarak antijen ve antikor moleküllerinin birbirine doğru yayılabildiği agar veya agaroz jel gibi yarı katı ortamlarda yapılmaktadır. Bu ortamlarda birbirine doğru ilerleyen antijenler ve antikorlar optimal oranda buldukları bölgelerde karşılaştıklarında bir presipitasyon çizgisi veya bantı oluşturarak çökelmektedir. Bu testlerin avantajlı yönü, antijen ve ona özgü antikor karışımının jel içindeki yayılma katsayılarındaki farklılık aracılığıyla fiziksel olarak ayrılabilmesidir. Bu şekilde, adı geçen testler reaksiyona giren antijen ve antikor moleküllerinin homojenliğinin ve saflığının yanında, boyutları ve akrabalıkları hakkında bilgiler sağlamaya yardımcı olmaktadır. Jelde presipitasyon testleri çeşitli biçimlerde uygulanabilmektedir (2, 7, 9-12) :

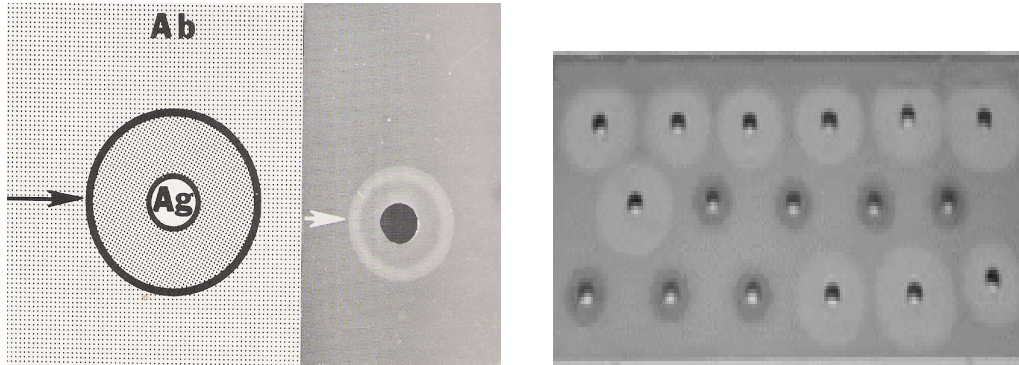
a. Tüpte Diffüzyon (Yayıma) Testi: Bu testte küçük tüpler içinde erimiş durumdaki agar veya jelatin, antiserum ile karıştırılmakta ve karışım katılaştıktan sonra üzerine ince bir tabaka ya da katman halinde antijen konulmaktadır. 37⁰C'deki bir ortamda birkaç gün bırakılan tüplerde üst kısma konulan antijenin agar veya jelatin içinde yayılarak burada kendisine özgü antikorla reaksiyona girdiği ve tüpün üst yüzeyinden biraz aşağıdaki bir yerde (antijen ve antikorun optimal yoğunlukta olduğu nokta) beyaz renkli bir kuşak veya bant oluşturduğu görülmektedir (Şekil 5). Kuşak veya bant oluşmasını antijenin konsantrasyonu ve yayılma katsayısı, molekül ağırlığı ve boyutu gibi faktörler etkileyebilmektedir (4, 8). Düşük molekül ağırlığı ve küçük boyuta sahip olan antijenlerin ortamda daha hızlı ve kolay yayılabildikleri saptanmıştır. Kuşak veya bandın meydana geldiği yerin üst kısma olan uzaklığı ise zaman, antikorun

konsantrasyonu ve kalitesi ile ilgilidir. Bu test Oudin testi olarak ta isimlendirilmektedir (6, 13, 14, 15).



Şekil 5. Tüpte diffüzyon testinde oluşan presipitasyonlar

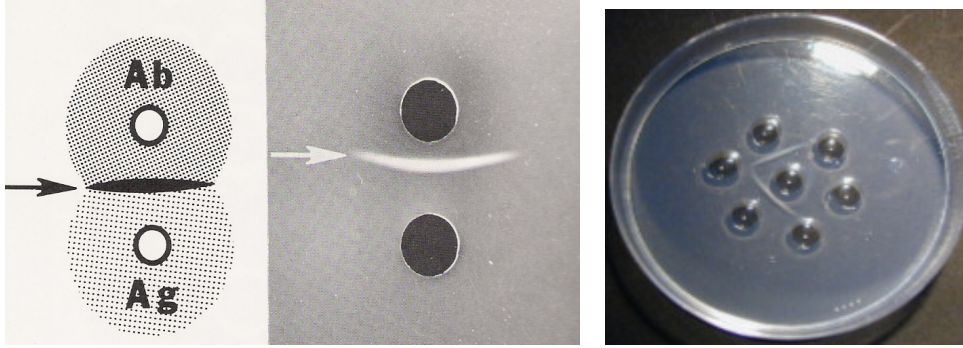
b. Radyal Diffüzyon (Tek Yönlü Yayılma) Testi: Mancini Tekniği de adı verilen bu test Tüpte Yayılma Testi'ne benzemektedir. Bu testte antikor içeren antiserum agarla homojen olarak karıştırılmakta ve karışım bir tabaka halinde lam, plak veya petri kabına konulmaktadır. Katılaşmadan sonra, agar üzerinde eşit aralıklarla ve aynı çaplara sahip olan küçük çukurlar açılarak bunların her birine farklı antijen veya bir antijenin çeşitli seyreltileri ilave edilmektedir. Daha sonra; lam, plak veya petri kabı 37 °C'de nemli bir ortamda muhafaza edilmektedir. Süre sonunda, antijen çukurlardan agarın içerisine doğru yayılmakta ve çukurların çevresinde beyaz renkli halka veya hale şeklinde bir presipat oluşmaktadır (Şekil 6). Çukurların çevresinde daire şeklinde beyaz halkanın oluşması pozitif olarak değerlendirilmektedir. Çukurların çevresinde oluşan dairelerin çapı ve pozisyonu antijenin konsantrasyonu ile ilgili bilgiler sağlamaktadır (4, 10). Bu testte meydana gelen çökelti halkasının çapının karesi ile çukurdaki antijenin konsantrasyonu arasında doğru orantının olduğu belirlenmiştir.



Şekil 6. Radyal diffüzyon testi (10)

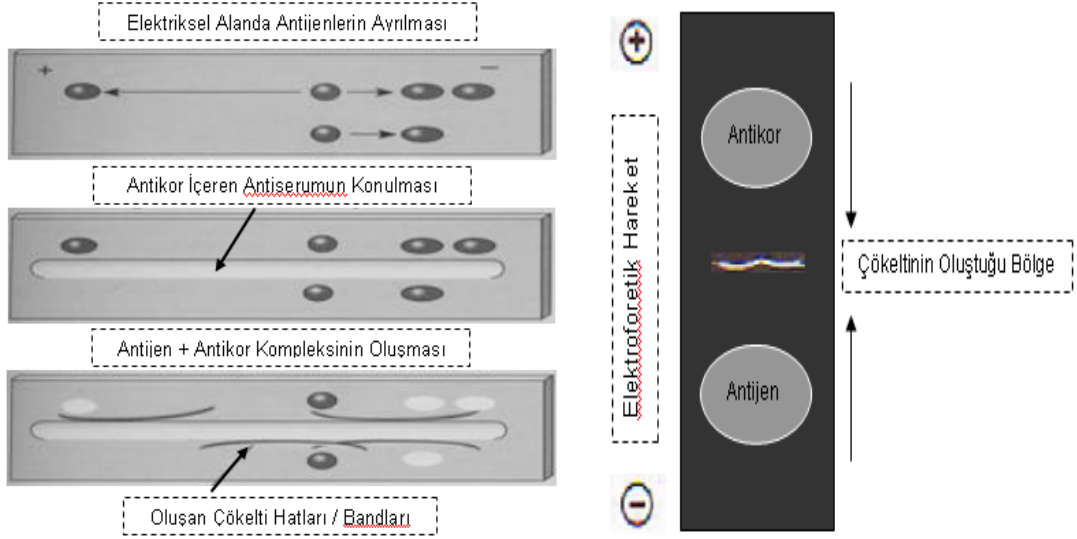
c. Çift Yönlü Diffüzyon (Yayılma) Testi: Bu test Ouchterlony testi adı ile anılmaktadır. Test için, petri kaplarına dökülen agar (% 0.7-1.5) üzerinde bir kalıp yardımıyla ortada bir adet ve bunun çevresinde ise 0,5-10 mm uzaklıklarda olmak üzere 4-6 adet çukur açılmakta ve çukurların iç kısımları boşaltılmaktadır. Ortadaki çukura bilinen bir antiserum veya antijen konulmaktadır. Eğer, ortadaki çukura bilinen bir antiserum konulmuş ise çevredeki çukurlara hastalıklı bitki öz suları veya ortaya bilinen bir antijen yerleştirilmiş ise etrafındaki çukurlara değişik antiserumlar pipet yardımıyla ilave edilmektedir. 37 °C'de 1-2 gün bekletilen petri kaplarında, gerek ortadaki ve gerekse bunun çevresindeki çukurlarda bulunan moleküller agar içine karşılıklı olarak yayılacakları için antijenle antikorun birleştiği yerlerde (ortadaki

çukurla çevresindekiler arasında) beyaz renkli bir çizgi ya da bant meydana gelmektedir (Şekil 7). Negatif durumlarda, çevredeki çukurlardan birisi veya diğerleri ile ortadaki çukur arasında presipitasyon hattının oluşmadığı gözlenmektedir (4, 6, 7, 9-11, 16).



Şekil 7. Agarda yapılan çift yönlü diffüzyon testinde oluşan çizgiler / bantlar (10)

- Immunoelktroforez Testi: Immunoelktroforez, çift yönlü jel diffüzyon testinin hızlandırılmış biçimde yapılan bir modifikasyonudur. Ancak, antijen ve antikorun yayılması elektriksel ortamda gerçekleşmektedir. Bu test antijen karışımlarının ayrılmasında, virüslerin ırk ayrımında ve karakterizasyonunda kullanılabilir. Yöntemin esası, antijenik özgüllük ve elektroforetik hareketliliğe dayanmaktadır. Bu testte, agar ince bir tabaka halinde lam üzerine yayılmakta ve agarda çukurlar açılmaktadır. Daha sonra, bu çukurlara antijenler eklenmekte ve lam bir elektrik alanına konulmaktadır. Antijen molekülleri bu elektrik alanında hareket ederek 7.5 ile 8.6 arasında değişen bir pH derecesinde elektrik yüklerinin farklı olması sebebiyle birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Elektroforezden sonra agardan hareket yönüne paralel olacak şekilde bantlar kesilip çıkarılmakta ve bu bantların yerlerine antiserumlar konulmaktadır. Antiserumun yayılması için bir süre beklenmekte ve uygun antijen antikorla karşılaştığında presipitasyon bantı oluşmaktadır. Bu yöntemin diğer bir uygulamasında (karşıt yönlü immunoelktroforez) ise, lam üzerindeki agarın bir ucunda açılan çukura antijen ve diğer ucundaki çukura ise antiserum yerleştirilmektedir. Antijen tarafına negatif elektrot ve antiserum tarafına da pozitif elektrot bağlanarak ortama uygun voltajda elektrik akımı verilmektedir. Antijenler pozitif uca ve antikorlar da negatif uca doğru giderlerken, karşılaştıkları yerde birleşerek beyaz çizgi ya da bant oluşturmaktadırlar (Şekil 8). Bu yöntemin diğer bir alternatifine ise, Laurell (Roket) immuno elektroforez adı verilmektedir (8). Burada, antikor içeren ve pH'sı antikorun hareketsiz antijenin negatif yüklü olmasını sağlayacak şekilde ayarlanmış olan agar üzerinde açılan çukurlara değişen konsantrasyonlarda antijen veya değişik antijenler eklenmektedir. Ortama elektriksel akım uygulandığında, rokete benzer şekilde presipitasyon bantları oluşmaktadır. Meydana gelen presipitasyon bantlarının yüksekliği eklenen antijen konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Standart eğri hazırlayarak kantitatif ölçüm de yapılabilir (2, 4, 6, 9, 11).



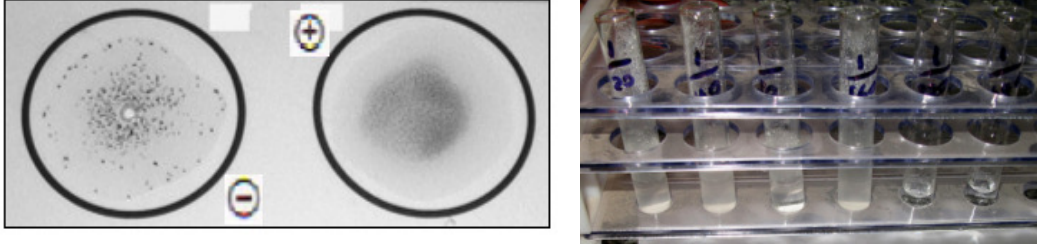
Şekil 8. İmmunoelektroforez testi'nde oluşan çizgiler / bantlar

AGLÜTİNASYON TESTİ

Bu test ile presipitasyon testi arasında farklılık, agglütinasyon testinde kullanılan antijenin genellikle antikordan daha büyük oluşudur. Bu nedenle, reaksiyonun oluşması için az sayıda antikor molekülü yeterli olmaktadır. Reaksiyonların oluşmasındaki ilkeler presipitasyon testindeki benzemektedir. Lam üzerinde veya tüpte yapılabilen bu testte, bitki enfekteli ise antikorlar kloroplastlara adsorbe olmuş partiküler yapıdaki antijen (virüs) moleküllerine bağlanmakta ve bu organellerin kümeler ya da yığınlar halinde bir araya toplandıkları çıplak gözle bile görülmektedir. Bu testte kullanılan antikorlar genellikle IgG ve IgM tipindedir. Agglütinasyon testinin mikropresipitasyon testinden yaklaşık 10-100 kez daha duyarlı olduğu ifade edilmektedir. Agglütinasyonun meydana gelebilmesi için aşağıdaki koşulların yerine getirilmesi gerekmektedir (1, 6, 9, 11):

- Ortamda serum fizyolojik gibi elektrolitler bulunmalıdır.
- Testler optimal sıcaklık derelerinde yapılmalıdır.
- Ortamın pH değerinin 7 (nötral) veya 7'ye yakın olması istenir.
- Görünür ve net bir reaksiyon elde etmek için, antijenin tuzlu suda iyice süspansiyon edilmesi gereklidir.

Agglütinasyon testinin doğrudan (direkt) ve dolaylı (indirekt=pasif) olmak üzere farklı biçimlerde uygulandığı belirtilmektedir. Doğrudan uygulama şeklinde antijen ile antikor içeren antiserum bir araya gelmekte ve reaksiyonun oluşması izlenmektedir. Bu tip testler genellikle antiserum titresini tayin etmek için kullanılmaktadır. Dolaylı biçimde uygulanan testte ise, antijen ve antikorların belirlenmesi hedeflenmektedir. Bu amaçla; antijen ya da antikorlar reaksiyonları daha görünür duruma getirebilmek için, etkinliği olmayan ve çapları 0.6-0.8 mm olan latex, bentonit, polistren vb. gibi maddelerle kaplanmaktadır. Sıvı ortamda karıştırılan bu moleküller, kendi aralarında özgülük varsa, çıplak gözle görülebilen kümeler halinde birleşmektedir (Şekil 9).

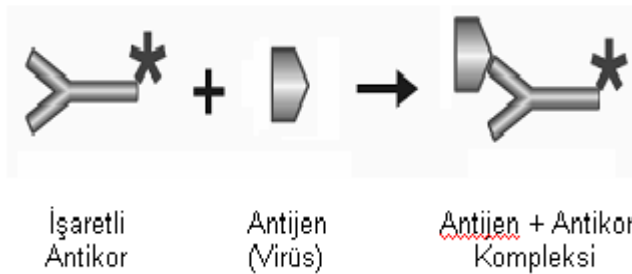


Şekil 9. Lam üzerinde ve tüpte yapılan Aglütinasyon testi

RADYOAKTİF MADDE, ENZİM VE FLUORESENS BOYA ARACILIĞI İLE YAPILAN TESTLER

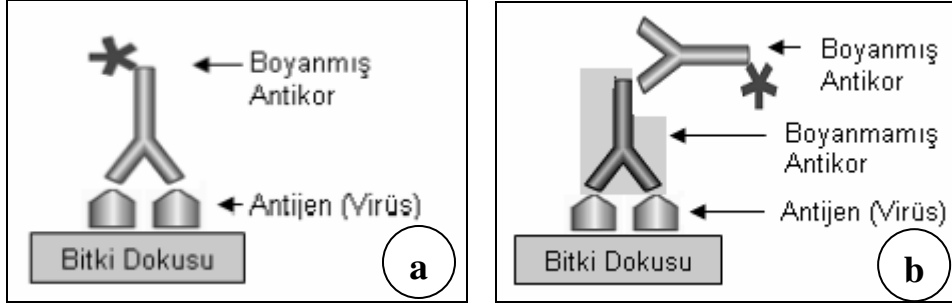
Bu testlerde, testlerin etkililiğini ve duyarlılığını arttırmak için antikorlara ya da antijenlere marker (işaretleyici) olarak adlandırılan radyoaktif maddeler (izotop), enzimler veya fluoresens boyalar eklenmekte ya da bağlanmaktadır. Markerların etkinliğinin yüksek olması, antijen-antikor reaksiyonun daha hızlı biçimde tanınmasını sağlamaktadır. Yapılan testler aracılığıyla antijen ve antikorun varlığını ve miktarını saptamak mümkün olmaktadır.

- Radioimmunoassay (RAI): Bu teknikte temel mekanizma, antikora bağlanan radyoaktif bir madde yardımı ile antijen-antikor birleşmesinin araştırılmasıdır. Burada antikorlara bağlanan radyoaktif maddeler arasında çoğunlukla iyot (I^{125} , I^{128} , I^{131}), fosfor (P^{32}) ve karbon (C^{14}) bulunmaktadır. Pozitif reaksiyonlarda, antijenle ile antikor birleştiğinde meydana gelen kompleks bir radyoaktivite kazanmakta ve radyo aktivitenin derecesi özel cihazlarla (gama sayacı gibi) saptanmaktadır (Şekil 10). Standart grafikler kullanılarak reaksiyona giren moleküllerin miktarları tayin edilmektedir (4, 6, 11) .



Şekil 10. Radioimmunoassay'in prensibi ve Gama sayacı

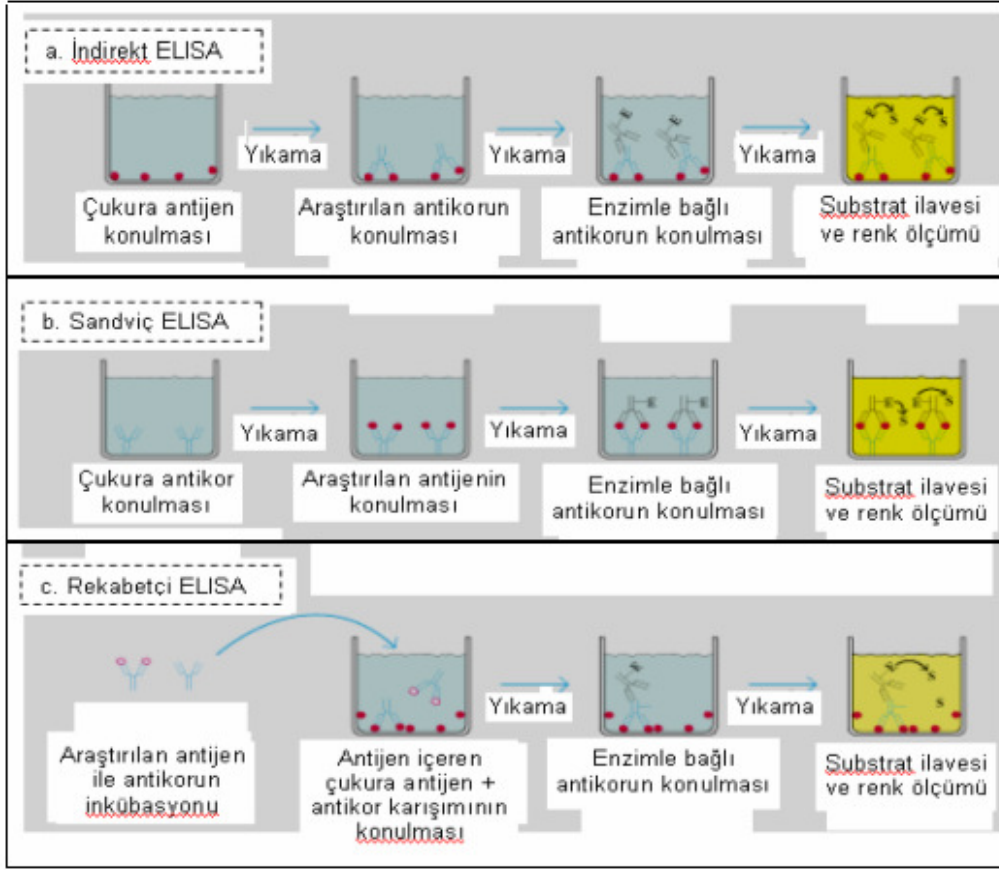
- Immunofluorescence (IFA): Antijen-antikor bağlanmasının gösterilmesinde bazı maddelerin fluoresans özelliklerinden yararlanılarak lam üzerinde yapılan testlerdir. Bu testte, antikorlar fluorokrom bir boya (FITC= fluorescein isothiocyanate, auramine, rhodamin, vs) ile boyanmaktadır. Test örneğinde bulunan antijenin üzerine boyalı antikorların konulması halinde, boyalı antikorlar antijenle birleşmekte ve UV-ışınları ile donatılmış bir mikroskopta sarı-yeşil renkte parlak bir fluoresans ışık vererek kolaylıkla fark edilebilmektedirler (Şekil 11). Örnekte virüsün olmaması durumunda fluoresans gözlenmemektedir. Kullanım alanı hayli geniş ve oldukça duyarlı olan bu test, Direkt IFA ve İndirekt IFA olmak üzere iki şekilde uygulanabilmektedir (1, 4, 6, 9, 11, 17, 18).



Şekil 11. Immunofluorescence tipleri ve elde edilen görüntüler
a. Direkt Immunofluorescence b. İndirekt Immunofluorescence

- **Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**: Bu test, yukarıda açıklanan testlere benzemektedir ve bazen Enzyme İmmuno Assay (EIA) olarak ta tanımlanmaktadır. ELISA ile antijen ve antikor araması yapmak ve bunların miktarlarını saptamak mümkün olmaktadır. Testte; özgül antijen-antikor ilişkisi, bu komplekse eklenen antikorlara alkalın fosfataz veya horse radish peroksidaz gibi bir enzimin bağlanması ve bu enzim substratının renkli ürünlere dönüştürülmesi suretiyle gösterilmesi esas alınmakta ve sonuçlar kolorimetrik olarak değerlendirilmektedir. Bir örnekte antijen (virüs) aranmasında, plastik (polistiren) yüzeylere bilinen antikor adsorbe edilmekte ve bunun üzerine şüpheli antijen konulmaktadır. Bir süre beklendikten ve yıkama yapıldıktan sonra, ortama aranan antijene özgül olan ve enzimle işaretlenmiş antikor ilave edilmektedir. Bekleme ve yıkama işleminden sonra, enzime uygun kromojen substrat eklenmekte ve oluşan renge göre değerlendirme yapılmaktadır. Bu testte, eğer örnekte, plastik yüzeye bağlanmış olan antikorlarla uyumlu antijen varsa, bunlar antikorlar ile birleşmekte ve bir kompleks oluşmaktadır. Ortama sonradan katılan, antijene karşı oluşturulmuş ve enzimle bağlanmış spesifik antikor da, bu kompleksteki antijene bağlanmaktadır. En son katılan kromojen substrat, komplekste var olan enzimle reaksiyona girerek renk vermekte ve kolorimetrik olarak değerlendirme (spektrofotometre veya görsel) yapılmaktadır (Şekil 12). Örnekte virüs yani antijen yok veya antikorla homolog değilse, renk meydana gelmemektedir. Çünkü, antijen-antikor kompleksi oluşmadığından enzimle işaretli ve antijene spesifik antikor da bu kompleksle birleşmemekte ve yıkama ile ortamdan uzaklaştığı için renk oluşumu olmamaktadır. Kromojen (renk verici) substratlar kullanılan enzime göre değişebilmektedir. Peroksidaz enzimi için 5-aminosalisilikasit, alkalın fosfataz enzimi için ise 4-nitrofenil fosfat kullanılmaktadır. ELISA 1976 yılından bu yana bitkilerin değişik organlarındaki virüslerin tanınmasında kullanılmaktadır. Diğer serolojik yöntemlere oranla daha basit, hızlı ve duyarlı olup kullanımında daha az miktarda antiseruma ihtiyaç bulunmaktadır (1, 2, 4, 19, 20). Bu tekniğin değişik amaçlar için yapılan aşağıda belirtilen farklı uygulama şekilleri mevcuttur:

- Direkt ELISA
- İndirekt ELISA
- Sandviç ELISA
- Rekabetçi (Competitive) ELISA



Şekil 12. Enzyme Linked Immunosorbent Assay tipleri

1990'lı yıllarda ELISA yönteminin uygulama ortamı ve uygulama şekline bağlı olarak DBIA (Dot Blot Immuno Assay) ve TBIA (Tissue Blot Immuno Assay) adlı bazı modifikasyonları ortaya konulmuştur. Bilindiği gibi, klasik ELISA çalışmalarında antijen (virüs) ya da antikor molekülleri amaca bağımlı olarak öncelikle polistiren nitelikli bir katı yüzeye uygulanmaktadır. DBIA ve TBIA adlı tekniklerde ise antijen protein bağlama özelliğine sahip olan nitroselüloz ya da naylon bir membrana bağlanmaktadır. Daha sonraki aşamada, bazı ELISA tiplerinde olduğu gibi sırasıyla primer antikor, enzimle işaretli sekonder antikor ve substrat uygulaması yapılmaktadır. Değerlendirmeler enzim ile substratın oluşturacakları renk reaksiyonuna göre gerçekleştirilmektedir. DBIA'da antijen nitroselüloz ya da naylon membran üzerine ekstrakt halinde, TBIA'da ise hastalıklı bitki kısımlarının kesik yüzeylerini membrana bastırmak ve sürtmek suretiyle emdirilmektedir. ELISA'ya oranla bu tekniklerin bazı avantajlı yönlerinin bulunduğu ifade edilmektedir. Bunlar arasında; daha az miktarda antijene ve reagentlere gerek duyulması, membranın ucuz ve protein bağlama kapasitesinin daha yüksek oluşu, özel bir ekipmana ihtiyaç olmaması, daha kısa sürede sonuç alınması, duyarlılığın yüksek olması ve rutin çalışmalarda kullanılabilmesi gibi özellikler yer almaktadır. Buna karşın; ELISA'nın ise sonuçların görsel yorumlama yerine kantitatif olarak elde edilmesi, antikorların protein kökenli bitki bileşenleri ile çoğunlukla reaksiyona girmemesi, antiserum kalitesinin sonuçlar üzerinde adı geçen iki teknikte olduğu kadar etkin olmaması ve kullanım yaygınlığının daha fazla olması gibi üstün yanları mevcuttur. Sonuç olarak, bu tekniklerin uygulanmasının prensip olarak ELISA ile aynı olduğu ve testlerin duyarlılığının birbirine yakın bulunduğu saptanmıştır (7, 11, 21).

IMMUNOSORBENT ELEKTRON MİKROSKOPİ (ISEM)

Bu yöntem, hücrelerde çok düşük konsantrasyonda olan virüsü ya da karışık enfeksiyonlar içindeki bir virüsü saptamak için kullanılmaktadır. Bu amaçla, grid üzerine arıtılmış virüs içeren özsu konulmakta ve üzerine virüse özgül antikolar içeren antiserum eklendikten sonra elektron mikroskopunda inceleme yapılmaktadır. Eğer; özsudaki virüs, ilave edilen antikora uygunsuz kümeleşme oluştuğu görülmektedir. Bu yöntemin diğer bir uygulama şeklinde ise, grid önce araştırılacak virüse özgü antikor ile kaplanmakta ve virüs bunun üzerine konulmaktadır. Daha sonra, antikor ile virüs birleşmesi elektron mikroskop aracılığıyla izlenmektedir. Adı geçen yöntem ile virüslerin tanılanmasını yapmak kolaylaşmakta ve aynı morfolojideki virüslerin birbirinden ayrılması mümkün hale gelmektedir (6, 22, 23, 24).

SEROLOJİK YÖNTEMLERİN DUYARLILIKLARI VE OLUMLU YA DA OLUMSUZ YÖNLERİ

Bitki virüslerinin tanısında özellikleri nedeniyle etmeni in vitro ortamlarda üretmek ve görmek pek mümkün olamamaktadır. Bu nedenle, virüs partikülünün protein kılıfının antijenik özelliklerinden yararlanılarak geliştirilen serolojik yöntemler uzun yıllardan beri bitkilerdeki virüslerin tanılanmasında yaygın biçimde kullanılmaktadır ve uygulama alanları ile çeşitliliği gün geçtikçe artmaktadır. Antijen ve antikorun özgül olarak birleşmesi esasına dayanan bu testlerde; virüsler (antijenler) ve antikolar belirlenebildiği gibi, virüsler arasındaki akrabalık ilişkileri, titre, konsantrasyon vb. kriterler kalitatif ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Serolojik yöntemlerin duyarlılıkları arasında farklılıklar olduğu belirtilmekte ve gerektiğinde bu yöntemlerin diğer tanı yöntemleri ile birlikte kullanılması önerilmektedir. Serolojik yöntemlerin duyarlılıklarına ilişkin bilgiler Çizelge 1'de verilmektedir (26, 27).

Çizelge 1. Serolojik Yöntemlerin Duyarlılıkları

Yöntem Adı	Tanılama Aralığı (µg/ml) *
Presipitasyon Testleri (Sıvı)	20-200
Presipitasyon Testleri (Jel)	
- Radial İmmunodiffüzyon	10-50
- Çift Yönlü İmmunodiffüzyon	20-200
- İmmunoelektroforez	20-200
Immunofluorescence Assay (IFA)	1-8
Aglütinasyon Testleri	0,3-0,06
İmmunosorbent Elektron Mikroskopu (ISEM)	0,001-0,01
Radioimmunoassay (RIA)	0,0006-0,006
Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	< 0,0001-0,008

* Antijenin varlığında pozitif reaksiyonun oluşması için gerekli olan en düşük antikor miktarı

Çizelge 1'deki verilere göre; serolojik yöntemlerin duyarlılık yönünden sıralamasını

ELISA / RIA / ISEM > Agglütinasyon Testleri > IFA / Presipitasyon Testleri

şeklinde yapmak mümkün olmaktadır.

Bitkilerde hastalık yapan virüslerin tanılanmasında sıklıkla kullanılan serolojik yöntemlerin olumlu ve olumsuz yönleri şunlardır (2, 7, 11, 17, 19, 20, 27):

Olumlu yönleri:

- Uygulanması kolay olan, duyarlı ve güvenilir yöntemlerdir.
- Çok sayıda örneği birlikte test etmek mümkündür.
- Virüs karışımlarını içeren örneklerle çalışma yapılabilmektedir.
- Diğer test yöntemlerine oranla daha kısa sürede sonuç alınabilmektedir.
- Mekanik olarak taşınmayan virüsleri tanılamak mümkündür.
- Çok sayıda patojenin ticari tanı kiti piyasada mevcuttur.
- Bazı testler arazi koşullarında da uygulanabilmektedir.
- Testler için küçük miktarda antiserum yeterli olmaktadır.
- Testlerin uygulama maliyeti düşüktür.
- Sonuçlar kantitatif olarak değerlendirilebilmektedir.

Olumsuz yönleri:

- *In vitro* sistemleri gelişmesine rağmen halen hayvansal materyal kullanımı gerekmektedir.
- Bazı virüslerin bu testlerde istenilen düzeyde reaksiyon vermediği görülmektedir.
- Bu testlerde çapraz reaksiyonlar ve hatalı pozitif sonuçlar elde edilmesi mümkündür.
- Protein ya da buna ilişkin bileşenlerin antijenik özellikleri zayıf olan virüslerin tanısında etkili değildir.
- Bazı yöntemler için başlangıçta yüksek bir ekipman maliyeti ile bilgi ve deneyim gerekli olabilmektedir.
- Özgül monoklonal antikoların seçimi ve üretiminde yüksek harcamalar gereklidir.
- Düşük konsantrasyonda elde edilebilen virüsler için ticari tanı kitleri bulunmamaktadır.

SONUÇ

Araştırma, mücadele ve hastalık yönetimi, gruplandırma ve ırk belirleme, epidemiyoloji, karantina, sertifikasyon, survey, ıslah vb. amaçlar için yapılan çalışmalarda bitkilerdeki virüslerin teşhisi ve tanılanması önem taşımaktadır. Bitkilerdeki virüslerin teşhis ya da tanısında ağırlıklı olarak simptomatoloji, biyolojik endeksleme, taşınma testleri, seroloji, nükleik asit temelli yöntemler ve elektron mikroskopi adlı yöntemlerden yararlanılmaktadır. Bazı durumlarda tek bir yöntem ya da teknik, araştırılan virüse bağımlı olarak teşhis için yeterli bilgi sağlayabilmektedir, ancak kesin sonuca ulaşmada genellikle birden fazla yöntemin bir arada kullanılması gerekmektedir. Teşhis ve tanılamada kullanılan yöntemlerin güvenli, özgül (spesifik), duyarlı, hızlı ve ekonomik olması istenilen özellikler arasındadır. Her yöntemin kendine özgü olumlu ve olumsuz yanları mevcuttur. Bitki virüslerinin teşhis ve tanısında serolojik yöntemler uzun yıllar önce kullanılmaya başlanmış olup günümüzde de bazı geliştirme ve modifikasyonlar yapılarak uygulanmasına devam edilmektedir. Serolojik yöntemlerin avantajlı olan yönleri arasında; belli bir virüse özgül olan reaksiyon vermesi, az miktarda enfekteli doku materyaline ve antiseruma gerek duyulması, rutin testlemelerde kullanılabilmesi, sonuçların kısa sürede ve kantitatif olarak elde edilebilmesi, testlerde yararlanılan tanı kitlerinin ticari olarak piyasada bulunması ve maliyetlerinin düşük olması vb. yer almaktadır. Buna rağmen,

son yıllarda geliştirilen ve nükleik asit temelli olan yöntemlerin serolojik yöntemlerle birlikte kullanılması, inceleme konusunu teşkil eden bitki virüslerinin doğru ve kesin olarak teşhis ve tanısını yapabilmek için uygulamalarda yerini almaya başlamıştır. Bununla birlikte; çalışmalarda kullanılacak olan yöntemin seçiminin eldeki kaynaklara, testi yürütenin bilgi ve deneyimine, uygulamanın yapılacağı laboratuvarın koşullarına, testler için gerekli olan reaktiflerin durumuna, testin duyarlılık düzeyine ve süresine, test edilecek örneğin durumuna, çeşidine ve miktarına bağlı olduğunu göz önünde tutmak yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Hull, R., 2009. Comparative Plant Virology Second Edition. Elsevier Academic Press, London, UK, XVI+376 p.
2. Naidu, R.A. and Hughes, J., d'A. 2003. Methods for the detection of plant virus diseases. [In: J., d'A. Hughes, B.O. Odu (Eds.): Plant Virology in Sub-Saharan Africa - Proceedings of Conference by IITA, 4–8 June 2001, Ibadan, Nigeria], pp. 233-260.
3. Tonukari, N.J., 2003. Serological versus molecular diagnosis. African J. Biotech., 2 (7): 169-170.
4. Hampton, R., Ball, E. and Boer, S. De, 1990. Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens: A Laboratory Manual. APS Press, Minnesota, U.S.A., VIII+389 p.
5. Erkan., S., 1992. Moleküler Biyoloji. Doğruluk Matbaacılık Ltd. Ş., Bornova, İzmir, VI+140 s.
6. Salazar, L. and Jayasinghe, U., 1997a. Techniques in Plant Virology - CIP Training Manual Sec.2.3.1. An Introduction to Serology. Intern. Potato Center, Lima, Peru, 13 p.
7. Van Regenmortel, M.H.V. and Dubs, M.C., 1993. Serological Procedures. [In: R.E.F. Matthews (Ed.): Diagnosis of Plant Virus Diseases, CRC Press, Florida, U.S.A., 384 p.], pp. 159-214.
8. Ball, E.M. 1974. Serological tests for the identification of plant viruses. American Phytopathol. Society Monograph, 31p.
9. Agrios, G.N., 2005, Plant Pathology "5th Edition". Elsevier Acad. Press, U.S.A., XXV+922 p.
10. Shepard, J.F., 1972. Gel-Diffusion Methods for The Serological Detection of Potato Viruses X, S and M. Montana Agric. Exp. Station, Montana State University, Bulletin No: 662, 72 p.
11. Dijkstra, J. and De Jager, C.P., 1998. Practical Plant Virology - Protocols and Exercises. Springer - Verlag, Berlin, Germany, XVI+459 p.
12. Salazar, L. and Jayasinghe, U., 1997b. Techniques in Plant Virology - CIP Training Manual Sec. 2.3.4. Double Diffusion Test In Gels (Ouchterlony). Intern. Potato Center, Lima, Peru, 3 p.
13. Becker, E.L., Munoz, J., Lapresle, C. and Lebeau, L.J., 1951. Antigen-antibody reactions in agar. II. Elementary theory and determinations of diffusion coefficients of antigens. J. Immunol., 67: 501-511.

14. Oudin, J., 1952. III. Techniques and analysis of the quantitative precipitin reaction. B. Specific precipitation in gels and its application to immunochemical analysis. *Methods Med. Res.*, 5: 335-378.
15. Rubenstein, H.M., 1954. Quantitative antigen analysis by the Oudin method. *J. Immunol.*, 73:322-330.
16. Ouchterlony, O., 1962. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progress in Allergy*, 6: 30-154.
17. Bowers, W., Gaffur, A. and Mayer, G., 2006. Immunology-Part One (Chapter 7). On-line textbook from the Department of Microbiology and Immunology at the University of South Carolina School of Medicine, U.S.A., <http://pathmicro.med.sc.edu/book/immunol-sta.htm>
18. Bauman, R.W., 2010. Immunization and Immune Testing (Chapter 17). *Microbiology with Diseases by Taxonomy*, Third Edition, pp. 490-510.
19. Crowther, J.R., 2001. *The ELISA Guidebook*. Humana Press Inc., New Jersey, U.S.A., XI+421 p.
20. Hunt, P.D. and Hall, R., 1993. Immunoblotting and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. [In: J.E.Hyde (Ed.): *Methods in Molecular Biology-Protocols in Molecular Parasitology*, Humana Press Inc., New Jersey, U.S.A., XVIII+470 p.], 21: 397-406,
21. Lin, N.S., Hsu, Y.H. and Hsu, H.T., 1990. Immunological detection of plant viruses and a myco-plasma like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology*, 80: 824-828.
22. Derrick, K.S., 1973. Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Virology*, 56: 652-653.
23. Milne, R.G. and Lesemann, D.E., 1984. Immunosorbent electron microscopy in plant virus studies. *Methods Virol.*, 8: 85-101.
24. Hayat, M.A., 2000. *Principles and Technics of Electron Microscopy "Biological Applications"*. Fourth Edition. Cambridge University Press, UK, XVII+545 p.
25. Rose, N.R., Mecario, E.C. de, Folds, J.D., Lane, H.C. and Nakamura, R.M., 1997. Antigen-Antibody Interactions: Principles and Applications. *Manual of Clinical Laboratory Immunology* 5th Edition, ASM Press, Washington, U.S.A., pp. 137-160.
26. Madigan, M.T. and Martinko, J.M., 2006. Diagnostic Microbiology and Immunology (Chapter 24). [In: M.T. Martinko and J.M. (Eds.): *Brock Biology of Microorganisms* 11th Edition, Pearson Prentice Hall Inc., New Jersey, U.S.A., XXV+992 p.], pp. 818-852.
27. Fox, R.T.V., 1998. *Principles of Diagnostic Techniques in Plant Pathology*. CAB International, UK, VIII+213 p.