

## **Mycoplasma mycoides subspecies mycoides'in Cıvciv Tracheal Organ Kültürüne Etkisinin İncelenmesi**

Mihriban ÜLGEN\*

Geliş Tarihi: 27.08.1999

**Özet:** Bu çalışmada danalardan izole edilen 2 adet *Mycoplasma mycoides subspecies mycoides* suşunun cıvciv tracheal organ kültürlerine etkileri incelendi. Tracheal organ kültürü bir günlük SPF (specific pathogen free) cıvcivlerden hazırlandı. Her iki izolat ve referens suş siliostatik aktivite gösterdi. Referens suş 12., 1 no.lu izolat 15., 2 no.lu izolat 14. günde siliostazis oluşturdu. Hem saha izolatları hem de referans suş TOK'nde sayıca artarak ürediler, sadece organ kültür vasatı içeren ortamda ise üreme gözlenmedi.

**Anahtar Kelimeler:** *Mycoplasma mycoides subspecies mycoides*, tracheal organ kültürü, patojenite

### **Investigation of the Effect of *Mycoplasma mycoides subspecies mycoides* in Chicken Tracheal Organ Cultures**

**Summary:** In this study, the effect of two *Mycoplasma mycoides subspecies mycoides* strains isolated from cows were investigated in chicken tracheal organ cultures. Tracheal organ cultures were prepared from one-day-old SPF (specific pathogen free) chicks. The two isolates and reference strain showed siliostatic activity. Reference strain, isolate no.1 and isolate no.2 caused ciliostasis on 12 days, 15 days and 14 days post-inoculation, respectively. Either the field isolates or reference strain multiplied in tracheal organ culture but can not multiply in organ culture medium.

**Key Words:** *Mycoplasma mycoides subspecies mycoides*, tracheal organ culture, pathogenity

### **Giriş**

Tracheal organ kültürü (TOK) *Mycoplasma türlerinin in-vitro patojenite çalışmalarında birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır*<sup>1-7</sup>. TOK'nin in-vivo test sistemlerine (deney hayvanı, embriyolu yumurta) göre avantajı; ekonomik oluşu, kontrolün kolay olması, infeksiyon prosesinin daha kısa zaman alışı, ortamın doğal ve steril oluşu, sekonder etken invazyonu olasılığının çok az oluşudur<sup>8,9</sup>. TOK'nde siliyalı epitel yapışan ve üreyen etken hücre fonksiyonunun bozulmasına ve dolayısıyla siliar aktivitenin durmasına (siliostazis) neden olur<sup>1,8</sup>. Siliostazis oluşumu da etkenin patojenitesini kantitatif olarak belirleme olanağı sağlar<sup>1,8,10</sup>.

Bu çalışmada pneumonili danalardan izole edilen olan 2 *M. mycoides subsp. mycoides* suşunun cıvciv tracheal organ kültüründeki etkisi ve üremesinin incelenmesi amaçlanmıştır.

### **Materyal ve Metot**

**Referens *Mycoplasma* Suşu:** *M. mycoides subsp. mycoides* (V5) suşu Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsünden sağlandı.

**Saha suşları:** Bulaşıcı Sığır Pleuropneumoni (CBPP)'li danalardan izole edilen 2 adet *M. mycoides subsp. mycoides* suşu.

**Besiyerleri:** Referens suş ve saha izolatlarının CFU (colony forming unit) / ml ola-

\* Doç. Dr., U.Ü. Vet. Fak. Mikrobiyoloji A.D., Bursa-Türkiye

rak sayılarını belirlemek amacıyla selektif mycoplasma sıvı ve katı besiyerleri kullanıldı<sup>11</sup>.

**Organ kültür vasatı:** Aşağıdaki formüle göre hazırlandı<sup>12</sup>:

Minimum Essential Medium (10 X) ..... 1 lt.  
Glukoz ..... 1 gr.  
NaHCO<sub>3</sub> (%5.6)..... 30 ml.  
Penisillin.....200 IU/ml  
Fungizone .....0.002 mg/ml.

**SPF (Specific Pathogen Free) Yumurtalar:** Manisa Tavuk Hastahıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsünden sağlandı.

**Bakteri Sayılarının Belirlenmesi:** Rodwell<sup>13</sup>'in belirttiği metoda göre 10<sup>6</sup> CFU/ml sayıda Mycoplasma içeren dilusyonlar belirlendi. Bu dilusyonların hazırlandığı sıvı besiyerlerine talyum asetat katılmadı.

**Tracheal Organ Kültürünün Hazırlanması:** Bir günlük SPF civcivler omurilikleri kesilerek öldürüldükten sonra tracheaları aseptik koşullarda çıkarıldı ve hemen organ kültür vasatı içeren steril bir petri kutusuna kondu. Burada pens yardımı ile dış dokuları temizlendi, enjektör yardımı ile tracheanın içinden organ kültür vasatı geçirilerek iyice yıkandı. Daha sonra trachea bistüri ile ortalama 0.5-1 mm kalınlığında halkalara ayrıldı. Bu halkalar, içinde vasat bulunan steril küçük bir şişeye aktarıldı, çalkalayarak ve birkaç kez vasat değiştirilerek mukus ve hücre döküntülerinden arındırıldı. Son olarak içine vasat eklenerek 37°C'de % 5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 24-48 saat tutuldu. Bu süre sonunda halkalar tekrar yıkandı. Bu şekilde iyice temizlenen halkalar mikroyetlere aktarıldı ve üzerine organ kültür vasatı ilave edildi. Her bir tracheal halkanın siliar aktivitesi mikroskopta 80X büyütme ile incelendi ve %100 siliar hareketlilik görülen halkalar inokulasyon yapmak için seçildi<sup>10</sup>.

**TOK'ne İnokulasyon:** Tracheal halkaların içinde buldukları vasat uzaklaştırıldı. Suşların 10<sup>6</sup> CFU/ml sayıda Mycoplasma içeren

dilusyonlardan 0.1 ml alınarak tracheal halkalara inokulasyon yapıldı. Her bir suş için 2'şer halka kullanıldı ve iki halkaya da sadece sıvı besiyeri inokule edilerek negatif kontrol olarak bırakıldı. Ayrıca her bir suş için halka içermeyen sadece organ kültür vasatı bulunan birer çukura da aynı miktarda ekim yapıldı. 1 saat 37°C karbondioksitli etüvde inkübe edildikten sonra halkalara 0.2 ml. organ kültür vasatı ilave edildi<sup>14</sup>.

**Siliar Aktivitenin İncelenmesi:** Tracheal halkalar 15 gün süreyle her gün doku kültürü mikroskopunda 80X büyütme ile incelendi ve halkaların siliar aktiviteleri % oran olarak kaydedildi<sup>14</sup>.

**Üremenin Kontrolü:** İnkubasyonun 5. ve 15. günlerinde mikroyetlin her bir çukurundaki mikroorganizma sayısı Rodwell<sup>13</sup>'in belirttiği metoda göre belirlendi.

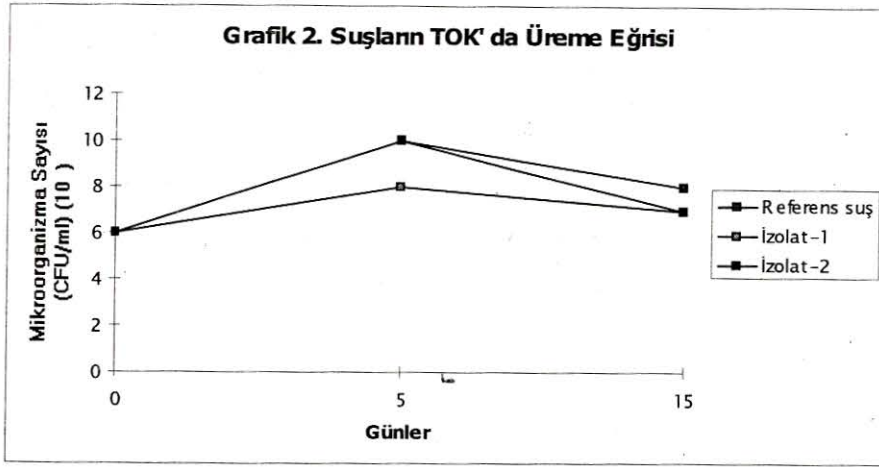
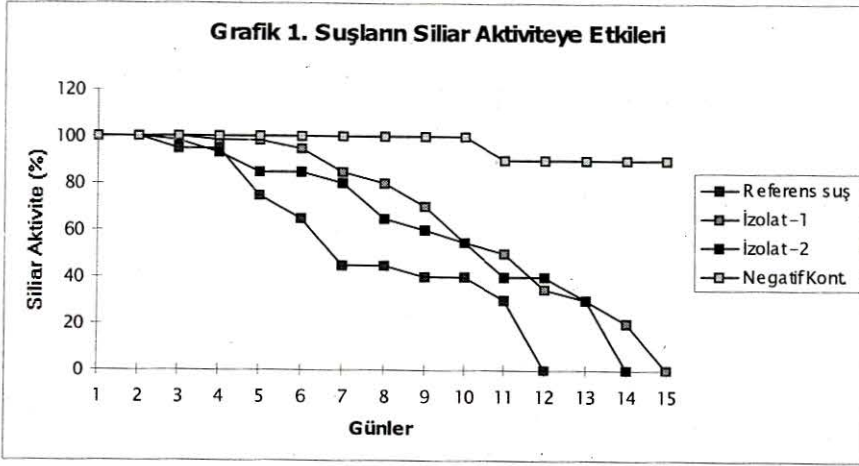
## Bulgular

**Suşların Siliar Aktivite Üzerine Etkileri:** Referens suş 12., 1 no.lu izolat 15. ve 2 no.lu izolat 14. günde siliar aktiviteyi durdurdu (Tablo-I ve Grafik. 1)

**Suşların TOK'nde Üremesi:** Tablo-I ve Grafik-2'de de görüldüğü gibi her üç suş TOK'nde üredi ve sayıları arttı. Sadece organ kültür vasatı içeren çukurlarda ise üreme olmadı.

**Tablo I: Suşların TOK'nde Üremeleri ve Siliostatik Etkileri**

Suş	İnokulum Miktar CFU/ml	Mikroorganizma Sayısı		Siliostatiz zamanı (gün)
		5.gün	15.gün	
Referens suş (M. mycoides subsp. mycoides V5)	10 <sup>6</sup>	10 <sup>10</sup>	10 <sup>8</sup>	12
İzolat-1	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	15
İzolat-2	10 <sup>6</sup>	10 <sup>10</sup>	10 <sup>7</sup>	14
Negatif Kontrol	-	-	-	15



## Tartışma

Tracheal organ kültürü kanatlı ve memeli orijinli Mycoplasma'ların patojenitelerini değerlendirme çalışmalarında birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır<sup>1-3,5-7,15-18</sup>. TOK'nde Mycoplasma'ların patojenitesi değerlendirilirken 2 kriter dikkat edilmektedir. Bunlardan birisi Mycoplasma suşunun siliostazisi oluşturması, diğeri de etkenin TOK'nde sayıca arttığının ortaya konulmasıdır. Moorthy ve Spradbrow<sup>7</sup> at orijinli Mycoplasma ve Acheloplasmaların civciv TOK'deki etkilerini incelemişler ve siliostazisi oluşumu ile artan mikroorganizma sayısı arasında bir korelasyon olduğunu belirtmişlerdir. Jones ve ark.<sup>3</sup>, *M. ovipneumoniae* ve *M. arginini*'nin koyun keçi TOK'nde sırasıyla 4. ve 2. günlerde siliostazisi oluştururken sayıca da arttığını ortaya koymuşlardır. Kumar ve ark.<sup>16</sup>, sığır meme orijinli Mycoplasma ve Acheloplasmaları hamster TOK'nde patojen ve nonpatojen olarak sınıflandırmışlardır. *M. bovis* ve *M. mycoides* var. *capri*'nin 12. günde siliostazisi oluşturdukları ve deneme sonunda TOK'nden izole edildikleri için bunları "patojen" ve *A. axanthum* ile *A.*

*laidlawii*'yi ise tekrar izole etmelerine rağmen siliostazisi oluşturmamaları nedeniyle "nonpatojen" olarak değerlendirmişlerdir. Buna karşın Thomas ve ark.<sup>5</sup>, *M. bovis* suşlarının sığır fotal TOK'ndeki etkisini araştırmışlar ve tüm suşların sayıca arttığı halde tam bir siliostazisi oluşturmadığını açıklamışlardır. Thomas ve Howard<sup>6</sup> pneumonili danalardan izole ettikleri Mycoplasma suşlarının sığır fotal TOK'ndeki etkisini incelemişler ve suşların deneme sonuna kadar üreyerek sayılarının arttığını ve siliostazisi oluşturdıklarını belirtmişlerdir. Kapoor ve ark.<sup>15</sup> da sığırların reproduktif sisteminden izole ettikleri Mycoplasma ve Acheloplasma türlerini hamster TOK'nde incelemişler, *M. mycoides* subsp. *mycoides*'in siliar aktiviteyi 8. günde durdurduğunu bildirmişler, ayrıca bu izolatin TOK'nde ürediğini ve deneme sonunda infekte tracheal halkalardan reizolasyon yapıldığını açıklamışlardır. Tavşan fallop tüp organ kültürlerinin kullanıldığı diğere bir çalışmada ise *M. mycoides* subsp. *mycoides* 10. günde siliostazisi oluşturmuş ve sayısı  $10^6$ 'dan  $10^{17}$ 'ye çıkmış, bu bulgulara dayanılarak izolat "patojenik" olarak değerlendirilmiştir<sup>17</sup>. Cherry ve Taylor-Robinson<sup>1</sup> TOK'nde

farklı türdeki hayvanlardan izole edilmiş Mycoplasma türlerini incelemişler 2 ayrı *M. mycoides* subsp. *mycoides* suşunun hem siliar aktiviteyi durdurma hem de TOK'nde üreme özelliklerinin birbirine benzemediğini rapor etmişlerdir. Suşlardan biri TOK'nde hem siliostazis oluşturup hem de sayıca artarken diğeri TOK'nde üremiş fakat siliostazis oluşturmamıştır.

Bu çalışmada ise pneumonili danalardan izole edilen 2 *M. mycoides* subsp. *mycoides* suşu, referens suş ile karşılaştırmalı olarak civciv TOK'nde incelenmiştir. Hem referens suş, hem de saha izolatları siliar aktiviteyi birbirine yakın zamanlarda durdurmuşlardır. (Tablo-I, Grafik-1). Suşlar TOK'nde üreme yönünden değerlendirildiğinde ise hepsinin sayılarının arttığı gözlenmiştir (Tablo-I, Grafik-2). Çalışmadaki bu bulgular diğer literatürler ile paralellik göstermektedir ve ayrıca siliostazis oluşumu ile artan mikroorganizma sayısı arasında bir korelasyon olduğunu rapor eden araştırmaları da desteklemektedir. Sonuç olarak patojenite kriterleri dikkate alındığında bu iki saha izolatının "patojen" olduğu kanısına varılmıştır.

### Kaynaklar

1. CHERRY, J.D., TAYLOR-ROBINSON, D.: *Mycoplasma* pathogenicity studies in organ cultures. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 225, 290-303, (1973).
2. CHERRY, J.D., TAYLOR-ROBINSON, D.: *Mycoplasma* pathogenicity studies in chicken tracheal organ cultures. *J. Pediatrics*, 78, 1065, (1971).
3. JONES, G.E., KEIR, W.A., GILMOUR, J.S.: The pathogenicity of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* in ovine and caprine tracheal organ cultures. *J. Comp. Pathol.*, 95, 477-487, (1985).
4. PINSON, D.M., SCHOEB, T.R., LİN, S.L., LİNDSEY, J.R.: Promotion of *Mycoplasma polmonis* growth in rat tracheal organ cultures by ammonium chloride. *Lab. Anim. Sci.*, 38, 143-147, (1988).
5. THOMAS, L.H., HOWARD, C.J., PARSONS, K.R., ANGER, H.S.: Growth of *Mycoplasma bovis* in organ cultures of bovine foetal trachea and comparison with *Mycoplasma dispar*. *Vet. Microbiol.*, 13, 189-200, (1987).
6. THOMAS, L.H., HOWARD, C.J.: Effect of *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Acholeplasma laidlawii* and T-mycoplasmas on explant cultures of bovine trachea. *J. Comp. Path.*, 84, 193-201, (1974).
7. MOORTHY, A.R., SPRADBROW, P.B.: The effect of *Mycoplasmas* and *Acholeplasmas* of equine origin on organ cultures of chicken-embryo trachea. *J. Comp. Pathol.*, 95, 209-215, (1985).
8. COLLIER, M.A., CARSON, J.L.: Tracheal organ cultures as models in pathogenicity studies. *Methods in Mycoplasmaology*, vol II, Academic Press, USA, 331-335, (1983).
9. AVAKİAN, A.P., LEY, D.H.: Protective immune response to *Mycoplasma gallisepticum* demonstrated in respiratory-tract washings from *M. gallisepticum*-infected chickens. *Avian Dis.*, 37, 697-705, (1993).
10. CHERRY, J.D., TAYLOR-ROBINSON, D.: Large quantity production of chicken embryo tracheal organ cultures and use in virus and *Mycoplasma* studies. *Appl. Microbiol.*, 19, 658-662, (1970).
11. COTTEW, G.S.: *Mycoplasmas* isolated from cattle in Australia. *Aust. Vet. J.*, 46, 378-381, (1970).
12. LU, Y.S., SHİEN, H.J., TSENG, C.S., LEE, S.H., LİN, D.F.: Swollen head syndrome in Taiwan isolation of an avian pneumovirus and serological survey. *Avian Pathol.*, 23, 169-174, (1994).
13. RODWELL, A.W., WHİTCOMB, R.F.: Methods for direct and indirect measurement of *Mycoplasma* growth. *Methods in Mycoplasmaology Vol.1.*, Academic Press, USA, 185-196, (1983).
14. POWER, J., JORDAN, F.T.W.: A comparison of the virulence of three strains of *Mycoplasma gallisepticum* and one strain of *Mycoplasma gallinarum* in chicks, turkey poults, tracheal organ cultures and embryonated fowl eggs. *Res. Vet. Sci.*, 21, 41-46, (1976).
15. KAPOOR, P.K., MAHAJAN, S.K., GARG, D.N., SINGH, Y.: Pathogenic effects of Mollicutes from bovines with reproductive disorders in hamster tracheal ring organ culture. *Indian Vet. J.*, 70, 393-396, (1993).
16. KUMAR, A., GARG, D.N., MAHAJAN, S.K.: Experimental pathogenicity of Mollicutes of bovine udder origin in hamster tracheal ring organ culture. *Indian J. Exp. Biol.*, 30, 607-610, (1992).
17. SINGH, Y., GARG, D.N., KAPOOR, P.K., MAHAJAN, S.K.: Experimental pathogenicity of mollicutes from bovines with reproductive disorders in rabbit fallopian tube organ culture. *Indian J. Exp. Biol.*, 29, 773-777, (1991).
18. ÜLGEN, M., ŞEN, A., MISİRLİOĞLU, D.: Civciv tracheal organ kültürlerinde *Mycoplasma gallisepticum*'un etkisi üzerine histopatolojik incelemeler. *Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, 8, 29-36, (1996).