

Mycoplasma mycoides subspecies capri ve Acholeplasma laidlawii'nin Cıvciv Tracheal Organ Kültürüne Etkisi

Mihriban ÜLGEN*

Geliş Tarihi: 07.10.1999

Özet: Bu çalışmada, *Mycoplasma mycoides subspecies capri* ve *Acholeplasma laidlawii*'nin cıvciv tracheal organ kültürüne etkisi incelendi. Her iki suş tracheal organ kültüründe siliar aktiviteyi durdurucu etki gösterdi ve sayıca artarak üredi. *Mycoplasma mycoides subspecies capri*'nin siliar aktiviteyi durdurma hızının inokule edilen mikroorganizma sayısına bağlı olduğu ortaya kondu.

Anahtar Kelimeler: *Mycoplasma mycoides subspecies capri*, *Acholeplasma laidlawii*, tracheal organ kültürü

The effect of Mycoplasma mycoides subspecies capri and Acholeplasma laidlawii on Tracheal Organ Culture.

Summary: In this study, the effect of *Mycoplasma mycoides subspecies capri* and *Acholeplasma laidlawii* were investigated in chicken tracheal organ culture. The two strains showed cilia - stopping effect and multiply in tracheal organ culture. It was determined that the rapidity of cilia- stopping effect of *Mycoplasma mycoides subspecies capri* was related to the number of organisms inoculated.

Key Words: *Mycoplasma mycoides subspecies capri*, *Acholeplasma laidlawii*, tracheal organ culture

Giriş

Mycoplasma mycoides subspecies capri bilindiği gibi keçilerde yüksek oranda mortalite oluşturan ve ekonomik öneme sahip Salgın Keçi Ciğer Ağrısı (CCPP) hastalığının etkenidir¹⁻³. *Acholeplasma laidlawii* ise hemen hemen tüm hayvanlar ve insanların ağız boşluğu, solunum ve genital sistem sekresyonları, göz lenf yumrusu, semen ve serumlarından izole edilen bir mikroorganizmadır ve patojenitesi konusunda farklı görüşler mevcuttur⁴. *M. mycoides subsp. capri* ve *A. laidlawii*'nin doğal ve deneysel şartlardaki patojenezleri birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir⁵⁻⁸. Tracheal Organ Kültürü (TOK) de bu amaçla kullanılan bir in-vitro sistemdir ve hem

kullanışlı hem ekonomik hem de güvenilir oluşu nedeniyle tercih edilmektedir^{6,9-13}.

Bu çalışmada, *M. mycoides subsp. capri* ile patojenitesi konusunda farklı görüşler bulunan *A. laidlawii*'nin TOK'ündeki patojenitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Suşlar: *M. mycoides subsp. capri* ve *A. laidlawii* suşları Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı.

Besiyerleri: Suşların CFU (Colony Forming Unit)/ml olarak sayılarının belirlenmesi için selektif *Mycoplasma* sıvı ve katı besiyerleri kullanıldı⁴.

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

Organ Kültür Vasatı: Aşağıdaki formüle göre hazırlandı¹⁴.

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

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

Bakteri Sayılarının Belirlenmesi: Rodwell¹⁵'in belirttiği metoda göre 10³ ve 10⁶ 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 CO₂'li ortamda 24-48 saat tutuldu. Bu süre sonunda halkalar tekrar yıkandı. Bu şekilde iyice temizlenen halkalar mikropyletlere 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 seçildi¹⁶.

TOK'ne İnokulasyon: Tracheal halkaların içinde buldukları vasat uzaklaştırıldı. Suşların hem 10³ hem de 10⁶ CFU/ml. mikroorganizma içeren dilusyonlarından 0.1 ml. alınarak tracheal halkalara inokulasyon yapıldı. Suşların herbir dilusyonu için 2'şer halka kullanıldı ve iki halkaya da sadece sıvı besiyeri inokule edilerek negatif

kontrol olarak bırakıldı. Ayrıca herbir suş için halka içermeyen sadece organ kültür vasatı bulunan birer çukura da aynı miktarda ekim yapıldı. 37°C'de % 5 CO₂'li etüvde 1 saat inkübe edildikten sonra halkalara 0.2 ml. organ kültür vasatı ilave edildi¹⁷.

Siliar Aktivitenin İncelenmesi: Tracheal halkalar 15 gün süreyle her gün dokukültürü mikroskobunda 80X büyütme ile incelendi ve halkaların siliar aktiviteleri % oran olarak kaydedildi¹⁷.

Üremenin Kontrolü: İnkubasyonun 5. ve 15. günlerinde mikropyletin her bir çukurundaki mikroorganizma sayısı Rodwell¹⁵'in belirttiği metoda göre belirlendi.

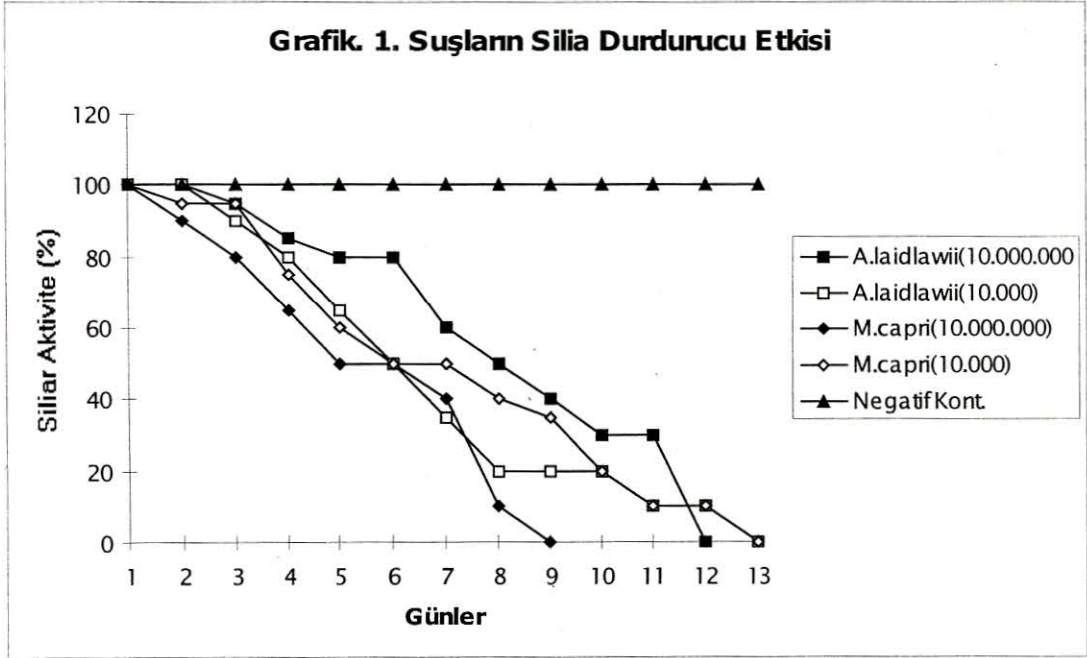
Bulgular

Suşların Siliar Aktivite Üzerine Etkileri: *M. mycoides subsp. capri*'nin 10⁶ CFU/ml. mikroorganizma içeren dilusyonu 9. günde, 10³ CFU/ml içeren dilusyonu ise 13. günde siliar aktiviteyi durdurdu. *A. laidlawii*'nin ise 10⁶ CFU/ml. mikroorganizma içeren dilusyonu siliar aktiviteyi 12. günde durdururken 10³ CFU/ml içeren dilusyonu 13. günde durdurdu. Negatif kontrolde ise siliar aktivite deneme sonuna dek sürdü (Tablo I, Grafik 1).

Suşların TOK'nde Üremesi: *A. laidlawii* ve *M. mycoides subsp. capri*'nin her iki dilusyonunda üreme gözlemlendi (Tablo I). Sadece organ kültür vasatı içeren çukurlarda ise üreme olmadı.

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

Suş	İnokulum Miktarı (CFU/ml)	Deneme Sonundaki Bakteri Sayısı (CFU/ml)	Siliostazis Zamanı (Gün)
M.mycoides	10 ³	10 ⁶	13
Subsp. capri	10 ⁶	10 ⁸	9
A. laidlawii	10 ³	10 ⁷	13
	10 ⁶	10 ⁸	12
Negatif Kont.	-	-	14<



Tartışma

M. mycoides subsp. capri ve *A. laidlawii*'nin patojeniteleri in-vivo ve in-vitro olarak birçok kez incelenmiştir^{5-13,18}. Bu amaçla kullanılan bir in-vitro sistem olan TOK'nde Mycoplasma türlerinin siliyar aktiviteyi durdurması ve sayıca artarak üremeleri patojenite kriteri olarak değerlendirilmektedir^{9,19}. Cherry ve Taylor-Robinson⁹, Mycoplasma türlerinin patojenitelerini civciv tracheal organ kültüründe incelemişler ve *M. mycoides subsp. capri*'nin sayıca artarak siliostazis oluşturduğunu; *A. laidlawii*'nin ise sayıca artarak ürediğini ancak siliostazis oluşturmadığını belirtmişlerdir. Kumar ve ark.¹¹da *M. mycoides subsp. capri* ve *A. laidlawii*'nin hamster tracheal organ kültüründe ürediklerini ve *M. mycoides subsp. capri*'nin siliyar aktiviteyi durdururken *A. laidlawii*'nin durdurmadığını rapor etmişlerdir. *M. mycoides subsp. capri*'nin TOK'deki siliostatik etkisinin inokule edilen bakteri sayısına göre değiştiği ortaya konmuştur^{9,10}. *M. mycoides subsp. capri*'nin 10^6 CCU (Color Change Unit) miktarı ile 3.3 günde % 50 siliostazis oluştururken, 10^2 CCU miktarının aynı etkiyi 7.9 günde gösterdiği bildirilmiştir⁹. Aynı şekilde Cherry ve Taylor-Robinson¹⁰da *M. mycoides subsp. capri*'nin siliostazis etkisinin TOK'ne inokule edilen bakteri sayısına bağlı ol-

duğunu belirtmişlerdir. Nitekim *M. mycoides subsp. capri* ile in-vivo olarak yapılan deneysel çalışmalarda da inkubasyon periyodu ve oluşan hastalık tablosunun inokule edilen bakteri miktarına göre arttığı yada azaldığı ortaya konmuştur^{5,8}.

Bu çalışmada ise *M. mycoides subsp. capri* 10^3 ve 10^6 CFU/ml olmak üzere iki farklı konsantrasyonda TOK'ne inokule edilmiştir. 10^3 CFU/ml. bakteri verilen tracheal halkalarda siliostazis 13. günde gözlenirken, 10^6 CFU/ml. bakteri inokule edilen tracheal halkalarda daha erken (9. günde) meydana gelmiş ve deneme sonunda her iki inokulum miktarının arttığı gözlenmiştir (Tablo. I, Grafik. 1). Çalışmadaki bu bulgular, *M. mycoides subsp. capri*'nin patojenitesini bir kez daha ortaya koymuş ve diğer araştırmalar ile uyumlu bulunmuştur.

A. laidlawii'nin patojenitesi konusunda farklı görüşler mevcuttur. Önceleri genellikle *A. laidlawii* saprofit bir etken olarak kabul edilmekte iken^{9,11,13}, son yıllarda yapılan çalışmalarda *A. laidlawii*'nin sığır ve keçilerde mastitis oluşturduğu ortaya konmuş^{7,20} ve sığır reproduktif sistem hastalıklarında patojenik rolü olduğu ileri sürülmüştür⁶. Ayrıca son yıllarda, *A. laidlawii*'nin TOK'nde incelendiği çalışmalarda siliostazis oluşturduğu ve sayıca artarak ürediği gözlenerek "patojen" olduğu sonucuna varılmıştır^{6,18}.

Bu çalışmada, *A. laidlawii* TOK'ne iki farklı konsantrasyonda (10^3 ve 10^6 CFU/ml) inokule edilmiş ve oluşturduğu siliostatik etkinin inokulum miktarına bağlı olmadığını saptanmıştır (Tablo. I, Grafik.1). Ayrıca deneme sonunda etkenin sayıca artarak ürediği gözlenmiştir (Tablo. I). Bu bulgulara dayanılarak ve patojenite kriterleri dikkate alındığında *A. laidlawii*'nin "patojenik" olduğu kanısına varılmıştır. Çalışmamızda ortaya çıkan bu sonuç son yıllarda yapılan çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur.

Kaynaklar

1. TIMONEY, J.F., GILLESPIE, J.H., SCOTT, F.W., BARLAUGH, J.E.: The Genera Mycoplasma and Ureaplasma, Hagan and Bruner's Infectious Diseases of Domestic Animals, 8. ed., Cornell Univ. Press, 295-317, (1988).
2. TAYLOR-ROBINSON, D. AND SMITH, G.R.: Mycoplasma diseases of man and animals, Topley & Wilson's Principles of Bacteriology, virology and Immunity, Eight edition, Vol.3 Bacterial Diseases, Smith, G.R., Easman C.S.F., Butler & Tanner, London, 657-572, (1990).
3. İZGÜR, M.: Mikoplazmalar, Özel Mikrobiyoloji, M. Arda, A. Minbay, N.Leloğlu, N. Aydın, M. Kahraman, Ö. Akay, A. Ilgaz, M. İzgür, K.S. Diker, Medisan, Ankara, 275-284, (1997).
4. RAZİN, S., FREUNDT, E.A.: The Mycoplasmas, Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, Vol.1, Noel R. Krieg, William & Wilkins, USA, 740-792, (1984).
5. SINGH, V.P. and SRIVASTAVA, N.C.: Mycoplasma mycoides subspecies capri infection in laboratory animals. Indian Vet. J., 70, 770, (1993).
6. 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).
7. SINGH, A., GUPTA, PP, BANGA, H.S.: Pathogenicity of Acholeplasma laidlawii for the goat udder, Aust. Vet. J., 67(4), 155-156, (1990).
8. SRIVASTAVA, N.C., SIKDAR, A., UPPAL, P.K.: Pathogenicity of Mycoplasma mycoides subsp. capri in goats by intratracheal route, Indian J. Anim. Sci., 59(5), 491-493, (1989).
9. CHERRY, J.D., TAYLOR-ROBINSON, D.: Mycoplasma pathogenicity studies in organ cultures. Ann. N. Y. Acad. Sci., 225, 290-303, (1973).
10. CHERRY, J.D., TAYLOR-ROBINSON, D.: Mycoplasma pathogenicity studies in chicken tracheal organ cultures. J. Pediatrics, 78, 1065, (1971).
11. 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).
12. 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).
13. 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).
14. LU, Y.S., SHIEN, 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).
15. RODWELL, A.W., WHITCOMB, R.F.: Methods for direct and indirect measurement of Mycoplasma growth. Methods in Mycoplasmaology Vol.1., Academic Press, USA, 185-196, (1983).
16. 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).
17. 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).
18. 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).
19. BUTLER, M.: Isolation and growth of Mycoplasma in human embryo trachea cultures, Nature, 224(8), 605-606, (1969).
20. KIRK, J.H., GLENN, K., RUIZ, L., SMITH, E.: Epidemiologic analysis of Mycoplasma spp isolated from bulk-tank milk samples obtained from dairy herds that were members of a milk cooperative, J. Am. Vet. Med. Assoc., 211(8), 1036-1038, (1997).