

CİVCİV TRACHEAL ORGAN KÜLTÜRLERİNDE MYCOPLASMA GALLİSEPTİCUM'UN ETKİSİ ÜZERİNE HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER

HISTOPATHOLOGICAL INVESTIGATIONS ON EFFECT OF MYCOPLASMA GALLISEPTICUM IN CHICKEN TRACHEAL ORGAN CULTURES

*Mihriban ÜLGEN** *Ayşin ŞEN** *Deniz MISIRLIOĞLU***

ÖZET

Civciv tracheal organ kültürlerinde iki mycoplasma gallisepticum saha suşunun sitopatojeniteleri incelendi. Tracheal organ kültürleri bir günlük SPF civcivlerden hazırlandı. Saha suşlarının siliar aktiviteyi durdurma zamanları referens suş ile paralel bulundu. Histopatolojik incelemede silyaların büyük oranda döküldüğü, lamina epitelyalisin yassılaştığı, epitel hücrelerin sitoplazmalarının vakuolleştiği, çekirdeklerinde piknoz oluştuğu ve bu hücrelerin yerlerinden döküldüğü gözlemlendi.

SUMMARY

The cytopathogenicity of two Mycoplasma gallisepticum field strains were investigated in chicken tracheal organ cultures. Tracheal organ cultures were prepared from one-day old SPF chick. Time of cilia-stopping effect of the strains were parallel to that of reference strain. In histopathological investigation, marked loss of cilia, flattening of lamina epithelialis, vacuolisation, pyknosis and desquamation of epithelial cells were observed.

GİRİŞ

Kanatlılarda CRD (Kronik Solunum Yolu İnfeksiyonu), özellikle diğer bakteri ve viruslarla komplike olduğunda ekonomik kayıplara yol açan önemli bir solunum yolu enfeksiyonudur (2) CRD'nin etkeni olan Mycoplasma gallisepticum'un solunum yollarına etki mekanizması tam olarak açık olmamakla birlikte, kabarcık benzeri bir uç yapı ile mukozaya yapıştığı bilinmektedir. Tracheadaki silyalı epitele de bu şekilde tutunan etken, salgıladığı nöyrominidaz ile konakçı hücre fonksiyonunun

*Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji ABD, Bursa

**Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Patoloji ABD, Bursa.

bozulmasına sebep olur (12,18,26). Doğal infeksiyonlarda bu hücre fonksiyonun bozulması başlangıçta kendini epitel hücrelerin hiperplazisi, siliar aktivitenin azalması ve zamanla durması şeklinde göstermektedir. Daha sonra mukoz bezlerde genişleme ve silyaların resim fırçası gibi birbirine yapıştığı, yer yer döküldüğü, infeksiyonun daha ileri safhasında ise mukozal tabakanın inceldiği, mukozanın çođu bölgede alttaki kıkırdaktan ayrılmış olduğu gözlenmektedir (14,21,25). Araştırmacılar doğal infeksiyonlardaki bu bulguların, *M.gallisepticum* ile infekte edilmiş tracheal organ kùltürlerindeki bulgular ile benzer olduğunu ortaya koymuşlar (3) ve *Mycoplasma*ların patojenitesinin incelenmesinde tracheal organ kùltürlerinin, deney hayvanı (civciv, hindi palazı) ya da embriyolu tavuk yumurtasına tercih edilebileceğini ileri sürmüşlerdir (6,7,17). Nitekim Dykstra ve ark.(9), *M. gallisepticum*'un sitopatolojik etkisini hem civcivlerde hem de tracheal organ kùltürlerinde incelemişler ve her iki sistemde de aynı sitopatolojik değişiklikler gözlediklerini belirtmişlerdir. Abu-Zahr ve Butler (1) ise, *M.gallisepticum* ile *M.gallinarum*'un sitopatojenitelerini tracheal organ kùltürlerinde karşılaştırmışlar ve *M.gallisepticum* ile infekte tracheal halkaların silyalarını kaybettiklerini, epitel hücrelerin sitoplazmalarında vakuolleşmeler, çekirdekte piknoz oluştuğunu, epitel hücrelerin zamanla döküldüğünü ve lamina epitelialisin yassılaştığını bildirmişlerdir. *M.gallisepticum* ile *M. synoviae*'nin patojenitelerinin tracheal organ kùltürlerinde incelendiği diğer bir çalışmada ise, *M.gallisepticum*'un silyalarda tamamen dökülmeye ve epitel hücrelerde yassılaşmaya sebep olduğu gözlenmiştir. *M.synoviae*'nin ise iki farklı suşunun farklı etki oluşturduğu ancak bu etkilerin *M.gallisepticum*'un etkisinden daha hafif olduğu belirtilmiştir (11).

Araştırmacılar tracheal organ kùltürlerini farklı konakçılardan izole edilen *Mycoplasma* suşlarının sitopatojenitelerini incelemek amacıyla (23,24) ve *Mycoplasma*ların birbirleriyle ve solunum sistemi virüsleriyle etkileşim halinde oluşturdukları bozuklukları incelemek amacıyla (13,19,20,25) da yaygın olarak kullanmışlardır. Bu in-vitro sistemin kontrolünün kolay olması, infeksiyon prosesinin kısa zaman alışı, ortamın doğal ve steril oluşu gibi avantajları olduğu bildirilmiştir (8).

Bu çalışmada saha izolatu olan iki *M.gallisepticum* suşunun tracheal organ kùltürlerinde oluşturduğu histopatolojik değişiklikleri referens suş ile karşılaştırarak incelemek amaçlandı.

MATERYAL-METOT

Referens *Mycoplasma* Suşu: *Mycoplasma gallisepticum* S6 suşu Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsünden sağlandı.

Saha Suşları: CRD'li tavuklardan izole edilen iki adet *Mycoplasma gallisepticum* suşu kullanıldı. Besiyerleri: Referens suş ve saha suşlarının CFU(Colony Forming Unit) /ml olarak sayılarını belirlemek amacıyla FM4 sıvı besiyeri (10) ve Mohammed Agar (16) kullanıldı.

Organ Kültür Vasatı: Lu'nun (15) belirttiği formüle göre hazırlandı ve tracheal halkaların canlılıklarının devam ettirilmesi için kullanıldı.

SPF (Spesifik Pathogen Free) Yumurtalar: Bir günlük SPF civcivleri elde etmek amacıyla embriyolu SPF yumurtalar Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü'nden sağlandı.

Mikropleyt: Steril, kapaklı, düz tabanlı, 96 gözlü mikropleytler (NUNC) tracheal halkaların konması için kullanıldı.

İnverted Mikroskop: Tracheal halkaların aktivitelerini incelemek amacıyla kullanıldı.

Suşların Sayılarının Belirlenmesi: Rodwell (22)'in belirttiği metoda göre 10⁶ CFU/ml sayıda *Mycoplasma* içeren dilusyonlar belirlendi.

Tracheal Organ Kültürlerinin Hazırlanması: Bir günlük SPF civcivler kullanılarak Cherry(4)'nin belirttiği metoda göre tracheal organ kültürleri hazırlandı. Mikropleytin herbir gözüne bir halka gelecek şekilde yerleştirildi ve üzerlerine organ kültür vasatı ilave edildi. Halkaların siliar aktiviteleri mikroskopta incelendi ve %100 siliar aktivite gösteren halkalar seçildi.

Organ Kültürlerine İnokulasyon: Suşların 10⁶ CFU/ml sayıda mikroorganizma içeren dilusyonlarından 0.1 ml alınarak tracheal halkalara inokulasyon yapıldı. Her bir suş için 3'er halka kullanıldı ve 3 halkaya da sadece sıvı besiyeri inokule edilerek negatif kontrol olarak bırakıldı.

Siliar Aktivitenin İncelenmesi: Tracheal halkalar her gün 80x büyütme ile incelendi ve halkaların siliar aktiviteleri % oran olarak değerlendirildi (4).

Histopatolojik İnceleme: Tracheal halkalar siliar aktivitenin %100 durduğu gün %10'lik formol solusyonuna alındı ve bilinen rutin yöntemle parafin blokları hazırlandı. Mikrotomla 5-6 mikron kalınlığında kesitler alınarak, Hematoksilin-Eosin ile boyandılar ve ışık mikroskobunda değerlendirildiler. Negatif kontrol olarak kullanılan tracheal halkalara da aynı zamanlarda aynı işlemler uygulandı.

BULGULAR

İzolaların Siliar Aktivite Üzerine Etkileri: İki saha suşunun siliar aktiviteyi durdurma zamanları referens suş ile paralel idi. *M.gallisepticum* S6 Suşu 4.5

günde %50, 8 günde %100 siliostazis oluştururken; 2 nolu izolat 4 günde %50, 9 günde %100; 5 nolu ozolat 2.7 günde %50, 9 günde %100 olarak siliar aktiviteyi durdurdu (Tablo 1).

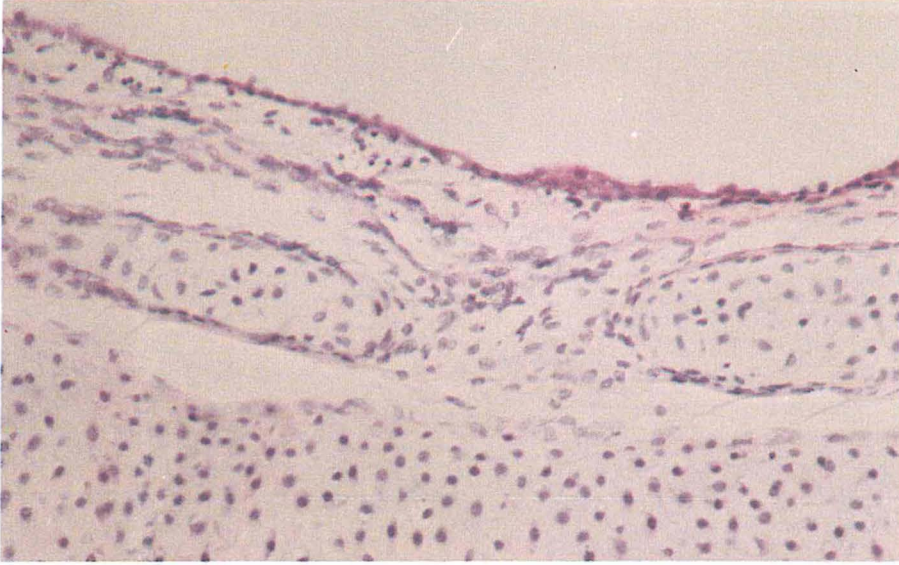
Histopatolojik Bulgular: Referens suş ile saha suşlarının tracheal halkalarda oluşturduğu bozukluklar benzer idi. Genel olarak tracheanın lumene uzanan epitel hücrelerinin apikal uçlarındaki kinosilyumların büyük oranda kayba uğradığı, yalancı çok katlı prizmatik epitel yapısındaki lamina epitelyalisin yer yer tek katlı yassı ve yer yer tek katlı kübik epitel halini aldığı gözlendi. Ayrıca epitel hücrelerinede sitoplazmada vakuolleşme ve çekirdekte piknoz gibi değişikliklerin görülmesi yanısıra epitel hücrelerinin yerlerinden ayrılarak lumene döküldükleri de gözlendi (Resim 1-2-2). Buna karşın negatif kontrol olarak bırakılan tracheal halkaların yalancı çok katlı prizmatik ve kinosilyumlu epitelinde herhangi bir hasar gözlenmedi (Resim-4).

Tablo-1 Suşların siliar Aktiviteyi Durdurma zamanları

Suş	%50 Siliostazis Zamanı (gün)	%100 Siliostazis Zamanı (gün)
Referens Suş (M.gallisepticum S6)	4.5	8
İzolat-2	4	9
İzolat-5	2.7	9

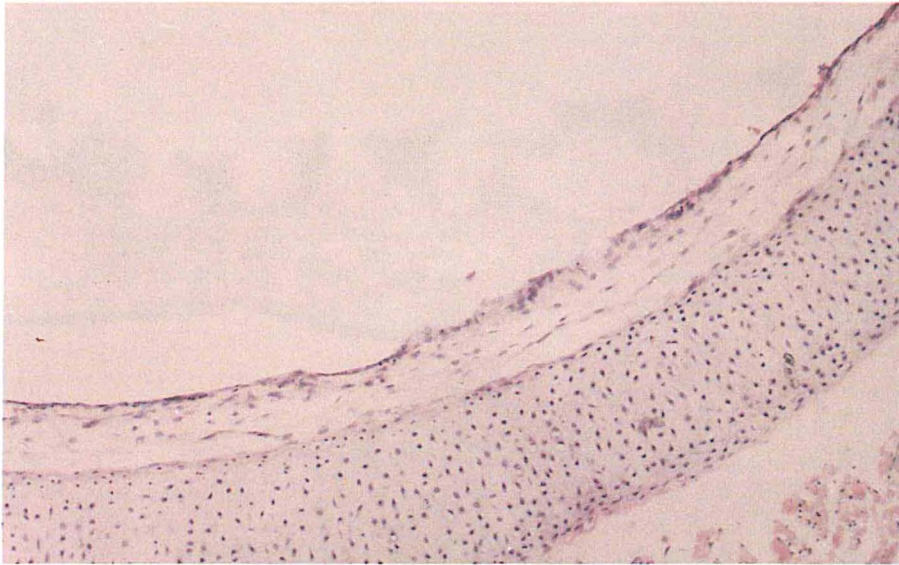
TARTIŞMA - SONUÇ

Tracheal organ kùltürlerinde Mycoplasmaların incelendiği çalışmalarda siliar aktiviteyi durdurma zamanları patojenite kriteri olarak değerlendirilmektedir (5). Civciv tracheal organ kùltürlerinde incelenen 58 adet Mycoplasma suşundan siliar hareketi durduran suşların solunum yolunu etkileyen patojen suşlar olduğu, silia-durudurucu etki (CSE) oluşturmayan suşların ise M. gallinarum gibi apatojen suşlar olduğu belirtilmiştir (7). Diğer bir çalışmada ise M.gallisepticum'un 4.8 günde %50 CSE oluşturduğu ortaya konmuştur (6). Hirano ve ark. (11)'nin yaptığı bir çalışmada da M.gallisepticum'un 10. günde siliar aktiviteyi tamamen durdurduğu gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise Referens suş 4,5 günde %50, 8 günde %100 siliostazis oluştururken; 2 ve 5 nolu izolatlar sırasıyla 4. gün ve 2.7 günde %50, 9 günde %100 siliostazis oluşturmuşlardır. Bu sonuçlara göre diğer araştırmacıların kriteri baz alınarak saha izolatlarımızın patojen olduğu sonucuna varılmıştır.



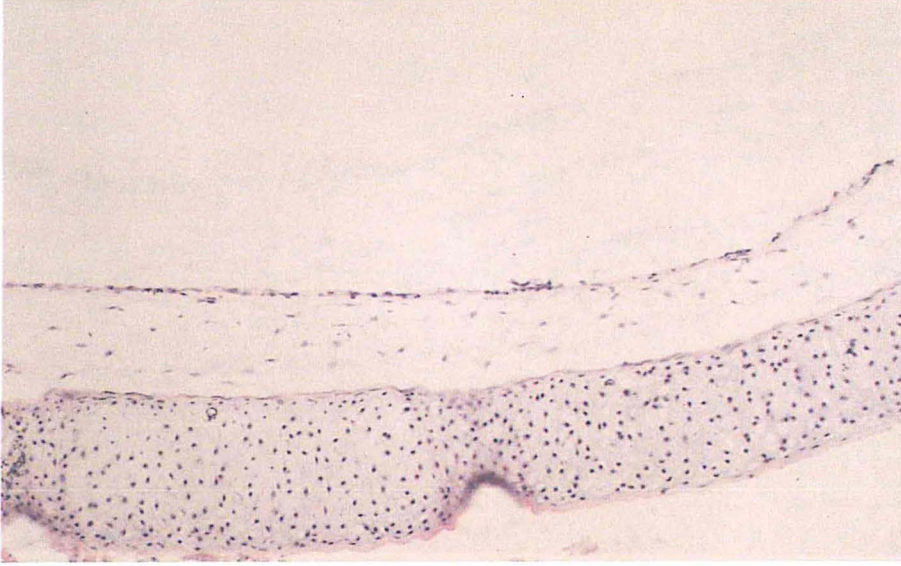
Resim 1. *Mycoplasma gallisepticum* S6 suşu ile infekte tracheal organ kültürü. Lamina epitelyaliste yassılaşıma ve epitel hücrelerinde belirgin kayıp. x320 H.E.

Figure 1. Tracheal organ culture infected with *Mycoplasma gallisepticum* S6 strain. Picture shows flattening of lamina epithelialis and marked loss of epithelial cells. x320 H.E.

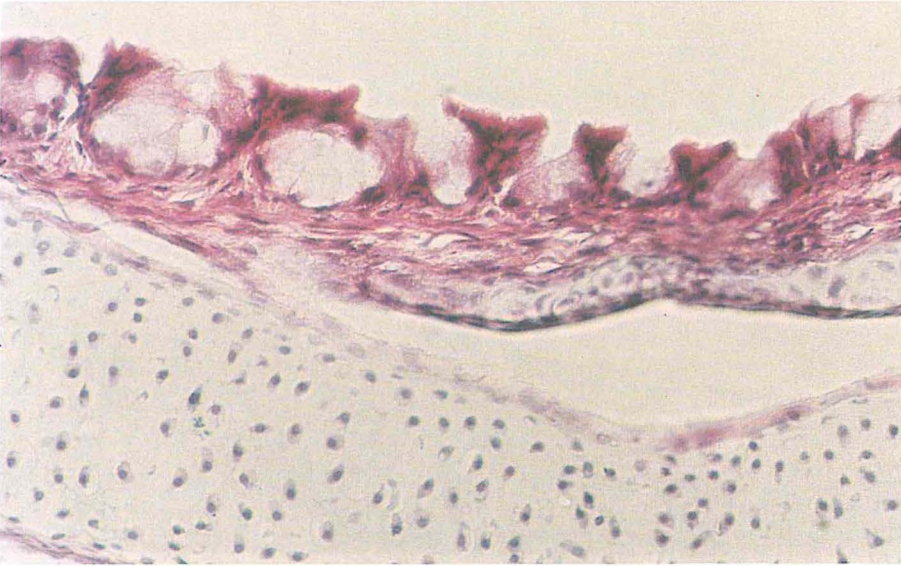


Resim 2. İzolat-2 ile infekte tracheal organ kültürü. Lamina epitelyaliste yassılaşıma epitel hücrelerinde kayıp. x320 H.E.

Figure 2. Tracheal organ culuter infected with isolate-2. Flattening of lamina epithelialis and loss of epithelial cells x320 H.E.



Resim 3. İzolat-5 ile infekte tracheal organ kùltürü.
Lamina epitelyaliste yassılaşma ve epitel hücrelerined kayıp. x320 H.E.
Figure 3. Tracheal organ culture infected with Isolate-5.
Flattening of lamina epithelialis end loss of epithelial cells x320 H.E.



Resim 4. Kontrol grubu tracheal organ kùltürü.
Normal yapısındaki epitel katman ve kinosilyumlar: x320 H.E.
Figure 4. Tracheal organ culture of control group.
Normal structure of lamina epithelialis and kynociliums are seen. x320 H.E.

M.gallisepticum'un doğal infeksiyon sonucu tracheada oluşturduğu histopatolojik bozuklukların tracheal organ kültürlerindeki bozukluklar ile benzer olması nedeniyle, tracheal organ kültürleri çeşitli araştırmacılar tarafından bu amaçla kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu çalışmalarda tracheal epitel hücrelerinde gözlenen etkiler kinosilyumların yıkınlanması ve kaybı, hücre sitoplazmalarında vakuolleşmeler, çekirdekte piknoz, epitelde desquamasyon ve lamina epitelyalinin yassılaşması şeklinde tanımlanmıştır (1,3,11,17). Bu çalışmada ise kinosilyumların büyük oranda döküldüğü, malina epitelyalinin yer yer tek katlı yassı ve yer yer tek katlı kübik epitel halini aldığı görülmüştür. Epitel hücrelerin sitoplazmalarında vakuolleşme ve çekirdekte piknoz gibi değişiklikler ile birlikte hücrelerde dökülme saptanmıştır. Bu bulgular diğer literatürler ile uyumlu bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. **ABU-ZAHR, M.N., BUTLER, M.**, Growth, cytopathogenicity and morfology of Mycoplasma gallisepticum and M.gallinarum in tracheal explants, J. Comp. Path., 86, 455-463, 1976.
2. **ARDA, M., İZGÜR, M.**, Kanatlılarda Mikoplasma İnfeksiyonları, Etlik Vet. Mikrobiol. Ens. Derg., 6,124-137, 1984.
3. **AVAKIAN, A.P., LEY, D.H.**, Protective immun response to Mycoplasma gallisepticum demonstrated in respiratory-tract washing from M.gallisepticum-infected chickens 37,3,697-705, 1993.
4. **CHERRY, J.D., TAYLOR-ROBINSON, D.**, Large-Quantity Production Organ Cultures and Use in Virus and Mycoplasma Studies, Applied Microbiology, 19,658,662, 1970.
5. **CHERRY, J.D., TAYLOR ROBINSON, D.**, Mycoplasma Pathogenicity Studies in Chicken Tracheal Organ Cultures, The Journal of Pediatrics, 78,6,1971.
6. **CERRY, J.D., TAYLOR ROBINSON, D.**, Growth and Pathogenicity Studies of mycoplasma gallisepticum in Chicken Tracheal Organ Cultures, J.Med.Microbiol., 4,441-449,1971.
7. **CHERRY, J.D., TAYLOR-ROBINSON, D.**, Mycoplasma Pathogenicity Studies in Organ Cultures, Annals New York Academy of sciences, 225, 290-303, 1973.

8. **CILLIER, A.M., CARSON, J.L.**, Tracheal Organ Cultures as Models in Pathogenicity Studies, Methods in Mycoplasmaology, editör Vol.II, Academic Press, U.S.A., 1983, p: 331-335.

9. **DYKSTRA, M.J., LEVISOHN, S.FLETCHER, O.J.**, Evaluation of cytopathologic changes induced in chicken tracheal epithelium by Mycoplasma gallisepticum in vivo and in vitro, Am. J. Res., 46, 1,116, 122, 1985.

10. **FREY, H.L., HANSON, R.P., ANDERSON, D.P.**, A Medium for the Isolation of Avian Mycoplasmas, Am.J.Vet.Res., 29, 11,2163-2169, 1968.

11. **HİRANO, H., HAYATSU, E., KUME, K., KAWAKUBO, Y., NAKAGAWA, S., NISHIYAMA, Y., YOSHIOKA, M.**, Ptahogenicity of Mycoplasma synoviae in Chicken Tracheal Organ Cultures, The Japanese Journal of Veterinary Science, 40,2,147-156, 1978.