

A. Ü. Veteriner Fakültesi Bakteriyoloji ve
Salgınlar Kürsüsü

Prof. Dr. Ö. Ertürk

MYCOPLASMA CAPRI'NİN YAŞAMA KABİLİYETİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Muzaffer Beşe*

Giriş

Bulaşıcı keçi ciğerağrısı hastalığı (Contagious caprine pleuropneumonia, C C P P) 1873 yılındanberi bilinmesine rağmen onun etiolojisi 1951 yılına kadar karışık kalmıştır (6,10). Ancak 1951 yılında Longley (12) ve 1952 yılında Durusan ve arkadaşlarının (5) araştırmaları ile hastalığın bir mycoplasmadan (Mycoplasma mycoides var. capri, kısaca M. capri) ileri geldiği tesbit edilmiştir. Bu bakımdan literatürlerde hastalık etkeninin çeşitli çevre şartları altında yaşama kabiliyeti hakkındaki bilgiler azçok değişiktir. Kolaylı ve arkadaşları (11) hastalık sebebi olarak izole ettikleri keçi Pasteurella susları kültürlerinin 37°C. de 35 gün bekletildikten sonra tekrar ürettiklerini, 5°C. de bir ay kadar canlı kaldıklarını tesbit etmişlerdir. Bekman (2) ın bildirdiğine göre; Stylianopoulos (1933) hasta keçinin hepatize akciğer ve pleura exudatının enaz 15 gün virulan kaldığını, bu materyalin laboratuvar derecesinde, buzlukta ve hatta % 50 gliserin ilâve edilmiş mahlûlde aynı sonucu gösterdiğini ; Naci Orpen, dondurulmuş keçi akciğerlerinin üç ay virusiyetini muhafaza ettiğini; Doukaloff (1935) virusun gübrelikte 8 gün, % 1 kreolin solusyonunda 5 dakikada öldüğünü; Longley (1940) binde 2.5 formolün 48 saatte öldürdüğünü; Pendik Bakteriyoloji Enstitüsünde, hepatize akciğer emulsiyonunun 3°C. de 30 gün bekletildikten sonra keçide hastalık husule getirdiğini tesbit etmişlerdir. Aygün (1) kurumuş hastalıklı materyalde hastalık etkeninin 24 saatte, güneş ışığında 4 saatte, steril

* A. Ü. Veteriner Fakültesi Bakteriyoloji ve Salgınlar Kürsüsü Doçenti. Ankara, Türkiye.

su içinde 24 - 30 saatte öldüğünü, Ertürk (7) hastalıklı keçi akciğer emülsiyonu ve göğüs boşluğu exudatının buz dolabında saklama süresi uzadıkça virusun, tavuk embriyosunu öldürme süresinin uzadığını, Ünlü (15) amnion sıvısı kültürünün 56° C . de yarım saatte, direkt güneş ışınlarının 1 saatte, binde bir süblime solusyonunun yarım dakikada öldürdüğünü, -20°C. de patolojik materyalde bir sene canlı kaldığını müşahede etmişlerdir. Sabin (14) agalactia'lı keçilerden izole edilen PPLO'ların serumlu buyyonda 37°C. de muhafaza edildiği zaman 3 günde öldüklerini, halbuki aerob olarak üretilen ve sonra vazelin ile örtülen kültürlerde organizmaların 37°C. de 22 ay canlı kaldıklarını, 0°, 6°, 12° ve 25°C. lerde bekletilen küütürlerde 5 ay kadar canlı kaldıklarını kaydetmektedir. Gürtürk (9) hastalıklı akciğer parçalarında M. mycoides var capri'nin - 20°C. de bir seneden fazla virüsü kaldığını, + 4°C. de bırakılan serumlu buyyon kültürlerinin 4 aydan fazla kaldıklarını, yumurta sarısı kültürlerinde 8 ay vi-siyetlerini muhafaza ettiklerini, 60°C. de tutulan serumlu buyyon kültürlerinin 30 dakika canlı kaldığını, halbuki allantois sıvısında 60° C. de 5 dakikada öldüğünü bildirmektedir. Araştırmacı (9) deneysel olarak enfekte edilen keçinin karaciğer, dalak, böbrek ve akciğer doku parçalarını oda derecesinde ve + 4°C. de iki ay beklettikten sonra hastalık etkenini izole etmiş, ancak 3 ay sonra + 4°C. de bırakılan materyallerden üretebilmiştir. Gray ve Turner (8) in bildirdiğine göre; Priestley ve arkadaşları (1948) P₂O₅ üzerinde vakuumda kurutulmuş olarak liyofilize edilen kültürlerin + 5°C. de enaz 3 yıl, 37°C. de bekletildiği zaman enaz 16 ay canlı kaldığını tesbit etmişlerdir. Priestley (13) Contagious bovine pleuropneumonia organizmin serumlu buyyon kültürleri ile yaptığı yaşama kabiliyeti testlerinde; bu organizmin 37°C. de takriben 50 gün, + 5°C. de takriben 150 gün, P₂O₅ üzerinde vakumda kurutulan organizmaların 37° C. inkubatorde en az 475 gün ve + 5°C. de 3 yıl canlı kaldığını müşahede etmiştir.

Gray ve Turner (8) dondurma - kurutma ile liyofilize edilen sığır contagious pleuropneumonia aşısının + 4°C. de enaz 41 ay sonra canlı sayımında çok az bir düşme olduğunu, oda derecesinde 41 ay bekletilen liyofilize aşı titresinin önemli derecede düştüğünü, fakat oda derecesinde 27 ay beklettikten sonra aşının kullanılabilirliğini göstermişlerdir.

Biz bu araştırmayı çeşitli çevre şartları altında M. capri suşlarının yaşama kabiliyetini tayin etmek amacı ile yaptık.

Materyal ve Metod

Çalışmalarımızda kullanılan 10 adet PPLO suşu, keçi orijinli olup yurdumuzun muhtelif bölgelerinden temin edilen akciğer ve pleura exudatından izole edilmişlerdir. Bu suşların, ne zaman ve nereden izole edildiği daha önce yapılan araştırmada bildirilmiştir (3).

İçerisinde % 10 oranında at serumu muhtevi Sığır kalp buyyonu ve agarı, % 10 defibrine koyun kanı muhtevi Tryptose agar besiyerleri çalışmalarımızda kullanıldı. Bu besiyerlerinin hazırlanışı daha önce bildirilmiştir (3).

PPLO suşlarının çeşitli çevre şartlarında yaşama kabiliyetlerini tayin etmek için Sığır kalp buyyonu 5 cc. miktarında tüplere taksim edildi. Sterilite kontrolü için bir gece 37°C. de bekletildi. Aynı besiyerinde 3 gün 37°C. de üretilmiş ve canlılık kabiliyetleri tayin edilecek kültürler 0.1 cc. miktarında inokule edildi. Üç günlük 37°C. de inkubasyondan sonra tüplerin pamuğu parafinlenerek 37°C., + 4°C., laboratuvar derecesinde (genellikle 20 - 22°C.) ve - 20°C. de muhafaza edildiler.

Her muayene periyodu esnasında kültürler buldukları şartlardan alınarak kalitatif olarak canlı sayım için 2 adet petri kutusundaki sığır kalp agarına 0.1 cc. miktarında inokule edildi ve steril cam bagetle petri kutusu yüzeyine iyice yayıldıktan sonra 37°C. de 4 - 5 gün inkube edildi. İnkubasyondan sonra üreme miktarı kalitatif olarak kontrol bir suşla mukayese edilerek değerlendirildi.

5 adet PPLO suşu yukarıda bildirildiği gibi üretilerek (Centrifugal freeze-drier, Model 2 A/137, W. E. Edwards and Co. London, Ltd.) cihazı ile liyofilize edildi ve - 20°C. de muhafaza edildi. Bu liyofilize suşlar muayyen aralıklarla yaşama kabiliyetleri yönünden yukarıda bildirildiği gibi muayene edildi.

23- H ve 7 - 1 suşlarına ait kültürler 2 adet keçiye deri altı yolu ile 0.5 cc. miktarında inokule edildi. Keçilerin 6 - 7 günde ölümünü takiben otopsileri yapıldı ve akciğerleri, steril birer büyük küvet içerisinde alınarak - 20°C de muhafaza edildi. Muayyen aralıklarla tekrar organizmi izole etmek ve kalitatif canlı PPLO miktarını tayin etmek için takriben 1 gr. miktarında alınan akciğer parçası steril bir havan içerisinde 5 cc. miktarında sığır kalp buyyonu ile suspansiyon edildi. Kaba partikülleri çöktürme gayesile takriben 1000 devirde 3 dakika santrifüj ettikten sonra cc. ne 2000 unite penicilin ilâve edildi ve 2 adet petri kutusundaki sığır kalp agarına 0.1 cc. mik-

tarında inokule edildi ve cam bığeetle agarın bütün yüzeyine yayıldı. 37°C. de 3 gün inkubasyondan sonra üreme miktarı tayin edildi.

Sonuçlar

Laboratuvar derecesinde (20 - 22°C.), 37°C. de ve + 4° de muhafaza edilen M. capri kültürleri birer ay aralıklarla kalitatif canlılık yönünden muayene edildi ve çizelge 1. de görüldüğü gibi sonuçlar elde edildi. Genellikle aynı şartlar altında muhafaza edilen M. capri kültürlerinin yaşama müddetleri arasında aşikar bir fark tesbit edilmedi. Bununla beraber her üç çevre şartlarında (laboratuvar derecesi, 37°C. ve + 4°C.) bazı suşlar, çizelge 1. de görüldüğü gibi, bir veya 2 ay fazla canlılık gösterdiler. Genel olarak M. capri suşları; laboratuvar derecesinde (20 - 22°C) 4 ay, 37°C. de 7 ay ve + 4° C. de 5 ay canlı kalmışlardır.

Çizelge 1. de bildirilen aynı suşlara ait kültürler -20° C. de muhafaza edilerek 6 ay aralıklarla kalitatif canlılık yönünden muayene edildi. Hepsinin 3 yıl sonra canlı oldukları tesbit edildi.

Dondurma - kurutma metodu ile liyofilize edilen 5 adet M. capri suşu (23 - H, 7 - 1, 29 - Ko, L- P2 ve 40 - T) -20° C. de muhafaza edilerek 6 ay aralıklarla kalitatif canlılık kontrolü yapıldı. Beş sene sonra bütün suşların canlı olduğu müşahede edildi ve bu arada liyofilize 7-1 suşu ile keçide yapılan infektivite testi müsbet sonuç vermiştir.

18 - 2 - 1954 tarihinde liyofilize edilmiş bir M. capri suşu (10. pasajda, Konya orijinli bir suş) Mütihazsıs Mesadet Doğuer'den 1958 yılında alındı (3,4). Bu suşa ait bir ampul 20 - 9 - 1968 tarihinde canlılık yönünden muayene edilerek bu suşun hala canlı olduğu müşahede edildi. Bu suşun, % 10 steril at serumu muhtevi Viande Foie (VF) besiyerinde üretilmiş kültürü, 1 cc. miktarında bir keçinin arka bacak derialtına inokule edildi. 24 saat sonra başlayan yüksek bir beden ısısı (41 - 42°C.), arka bacakta şekillenen sıcak, ağrılı ve yaygın bir ödem sonucu hayvan 8. günde öldü ve muhtelif organlardan yapılan muayenelerde saf kültür halinde M. capri izole edildi.

23 - H ve 7 - 1 suşları ile inokule edilerek öldürülen keçilere ait ve - 20°C de muhafaza edilen akciğerlerden 3 ay aralıklarla izolasyon çalışmaları yapıldı. Her iki materyalden her muayene periyodunda M. capri izole edilerek 2 sene müddetle yapılan muayenelerde izolasyon başarılı olmuştur.

T a r t ı Ő m a

Literatürde bulaşıcı keçi ciğerağrısı hastalığının etiolojisi uzun zaman değişik olarak mütalaa edildiğinden hastalık etkeninin çeşitli çevre şartları altında yaşama kabiliyetleri hakkındaki bilgiler birbirini tutmamaktadır. Hatta hastalığın sebebi *Mycoplasma capri* olarak kabul edildiğinden beri bu yönde yapılan araştırmalar sınırlı olup uzun süreli değildir. Ünlü (15) ve Gürtürk (9) - 20°C. de tutulan patolojik materyalde hastalık etkeninin bir sene canlı kaldığını, Gürtürk (9) + 4°C. de bırakılan serumlu buyyon kültürlerinin 4 ayda, serumlu buyyon kültürleri ile bulaştırılmış toprakta oda derecesinde 8 günde, halbuki güneş ışınlarına maruz şartlarda 5. günde öldüğünü bildirmişlerdir. Bu araştırmamızda liyofilize edilen *M. capri* kültürlerinin diğer çevre şartlarında muhafaza edilen kültürlere nazaran daha uzun müddet canlı kaldıklarını müşahede ettik.

Priestley (13) , Gray ve Turner (8), Gray ve Turner (8)'in bildirdiğine göre; Priestley, Miheimid ve Dafaalla (1948) liyofilize edilen *Bovine contagious pleuropneumonia* kültür ve aşılarının enaz üç sene canlı kaldığını, hatta Priestley (13) kurutulmuş *attenué* kültürlerinin orijinal kültürlerden daha virulent olduğunu, Gray ve Turner (8) ise liyofilizasyondan sonra virulansda bir artışa dair bir fikir beyan edilemeyeceğini bildirmektedirler. Yaptığımız araştırmalar ile liyofilize edilen *M. capri* suşlarının keçi için uzun seneler infektivitesini muhafaza ettiğini ve orijinal kültürlerde olduğu gibi keçiyi 6-8 günde öldürdüğünü tesbit ettik. Sonuç olarak bu bulguların ışığı altında *M. capri* canlı aşılarının kolaylıkla liyofilize edilebileceği, hatta belki de uzun bir süre bağışıklık kudretini muhafaza edeceği muhtemeldir. Bu da sıvı kültür aşıları yerine stabil bir kuru aşıya şiddetle ihtiyaç duyulan, laboratuvar servislerinin zayıf organize edildiği ve nakil güçlüklerinin mevcut olduğu memleketlerde büyük faydalar sağlar.

Ö z e t

10 adet *Mycoplasma capri* suşunun çeşitli çevre şartları altında yaşama kabiliyetleri kalitatif olarak araştırıldı.

M. capri kültürleri % 10 at serumu, penicillin ve thallium acetate ilâve edilmiş sığır kalp buyyonunda üretildi ve değişik sıcaklıklarda muhafaza edildi . Bu kültürler muhafaza esnasında muayyen aralıklarla yaşama kabiliyeti yönünden muayene edildiler.

Yaşama kabiliyetini tayin testleri; *M. capri* oda derecesinde 4 ay, 37°C. de 7 ay, + 4°C. de 5 ay ve -20°C. de 3 sene canlı kaldı-

+ 4°C.														
Aylar														
10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
-	-	-	4	2	3	2	1	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	4	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	4	2	3	1	1	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	4	2	2	2	1	-	-	-	1	-	-	-
-	-	-	3	2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	4	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	4	2	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	4	2	3	2	1	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	3	2	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	4	2	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-

ğını gösterdi. Aynı çevre şartlarında muhafaza edilen *M. capri* suşları arasında yaşama kabiliyeti yönünden büyük farklar yoktur. Genel olarak *M. capri* kültürleri, her muhafaza şartında zaman ilerledikçe canlılık kabiliyetinde bir düşme gösterdiler.

Deneysel olarak enfekte edilen 2 keçiye ait - 20°C. de muhafaza edilen akciğerlerde, *M. capri* 2 sene canlı kalmıştır.

Dondurma - kurutma metodu ile liyofilize edilen ve + 4°C. de muhafaza edilen 5 adet *M. Capri* suşu 5 sene sonra canlı idi. Dondurma - kurutma metodu ile liyofilize edilmiş ve + 4°C. de muhafaza edilen bir *M. capri* suşu 14 sene sonra canlı bulunmuştur. Keza bu suş, Ankara keçisi için infektivitesini muhafaza etmiştir. Bu liyofilize suşun, 1 cc. buyyon kültürü ile subkutan olarak inokule edilen bir Ankara keçisi 7. günde ölmüştür.

S u m m a r y

Viability studies of *Mycoplasma capri*

The qualitative viability of 10 strains of *Mycoplasma capri* under various environmental conditions was investigated.

The cultures of *M. capri* were grown in beef - hearth infusion broth supplemented with 10 percent horse serum, penicillin (1000 units per ml.) and thallium acetate (1: 2000 concentration), and stored at various temperatures. These cultures were tested for viability at certain intervals during storage.

Viability tests indicated that *M. capri* survived for about 4 months when stored at room temperature, 7 months at 37°C., 5 months at 4°C., and 3 years at - 20°C. There were no great differences on viability among the strains of *M. capri* which had been stored at the same environmental conditions. The cultures of *M. capri* showed a general trend towards decreasing viability at each storage temperature as time progressed.

M. capri remained viable for two years when the lungs from two experimentally infected Angora goats were stored at -20°C.

5 strains of *M. capri* lyophilized by freeze - drying were viable after 5 years storage at + 4°C. One strain of *M. capri* lyophilized by freeze - drying were viable after fourteen years' storage at + 4°C. This strain also retained its infectivity for Angora goat. An Angora goat inoculated subcutaneously with 1.0 ml. of broth culture from this lyophilized strain died in 7 days.

Literatür

- 1- **Aygün, S. T.** (1941): *Anadolu keçilerinin salgın ciğerağrısı ve savaş yolları üzerinde araştırmalar*. Yüksek Ziraat Enstitüsü çalışmalarından. 57. Yüksek Ziraat Enstitüsü Matbaası, Ankara.
- 2- **Bekman, M.** (1949): *Keçilerin salgın ciğerağrısı (Pleuro-pneumonia contagiosa caprae)*: Hüsnütabiat Basımevi, İstanbul.
- 3- **Beşe, M.** (1963): *Keçi ciğerağrısı hastalık etkeninin (Mycoplasma mycoides var. capri) izolasyonu: Biyolojik, biyosimik ve serolojik özellikleri*. A. Ü. Veteriner Fakültesi yayınları, 155. Çalışmalar, 93. Ankara.
- 4- **Doğuer, M.** (1968): *Özel konuşma*.
- 5- **Durusan, R., Atilla, C. ve Doğuer, M.** (1952): *Keçilerin salgın ciğerağrısı.-(pleuropneumonia contagiosa caprae) Etiolojisi üzerinde çalışmalar*. Türk Vet. Hekim. Derg., 64 - 65, 3 - 9.
- 6- **El Nasri, M.** (1967): *Mycoplasma from contagios caprine pleuropneumonia*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 143, 298 - 304.
- 7- **Ertürk, Ö.** (1953): *Salgın keçi ciğerağrısı (pleuropneumonia contagiosa caprae) Virusunun tavuk embriyosuna adaptation'u ve embryon aşısı ile keçilerde yapılan bağışıklık denemeleri*. Veteriner Fakültesi yayınları, 53. Çalışmalar. 29. Ankara.
- 8- **Gray, D. F. and Turner, A. W.** (1954): *Viability and immunizing potency of freeze-dried bovine contagious pleuropneumonia culture-vaccine*. J. comp. Path., 64, 116 - 126.
- 9- **Gürtürk, S.** (1959): *Keçi ciğerağrısı üzerinde çalışmalar. Bildiri: II. Keçi ciğerağrısı hastalığının epidemiyolojisi, hastalık tablosu, teşhis ve immunoloji*. Vet. Fak., Derg., 3-4, 268-280.
- 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- **Kolaylı, Ş., Köylüoğlu, M. R., Esin, İ. ve Arayıcı E.** (1934): *Anadolu keçilerinin bulaşık zatülcenp ve Riesi üzerindeki original araştırmalar*. Pendik Bakteriyoloji Enstitüsü Neşriyatından. Devlet Matbaası, İstanbul.
- 12- **Longley, E. O.** (1951): *Contagious caprine pleuro-pneumonia. A study of the diseases in Nigeria*. Colonial research publications, No. 7. London.: H. M. Stationary office.

- 13- **Priestley, F. W.** (1952): *Freeze-drying of the organism of contagious bovine pleuro-pneumonia*. J. comp. Path. 62, 125-135.
- 14- **Sabin, A. G.** (1941): *The filtrable microorganisms of the pleuropneumonia group*. Bact. Rev., 5, 1, 1 - 68.
- 15- **Ünlü, M.** (1962): *Salgın keçi ciğerağrısı (Pleuropneumonia contagiosa caprae) hastalığının etkeni, tedavi ve korunması üzerinde çalışmalar*. Etlık Veteriner Bakteriyolojisi Enstitüsü yayınları, Güzel İstanbul Matbaası, Ankara.

Yazı "Dergi Yazı Kuruluna" 13. 1. 1969 günü gelmiştir.