

Domuzlarda *Actinobacillus pleuropneumoniae* Varlığının PCR ile Araştırılması

Kemal METİNER^{1*}, A. Funda BAĞCIGİL¹, Serkan İKİZ¹, N.Yakut ÖZGÜR¹, Seyyal AK¹,
Atilla ILGAZ¹

¹İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Abd, 34320, Avcılar, İstanbul

* Sorumlu yazar: Kemal METİNER,

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Abd, 34320 Avcılar, İstanbul
e-posta: kmetiner@hotmail.com, Tel:0212 4737070 /17049

Geliş Tarihi / Received: 11.11.2010

ÖZET

Türkiye'nin farklı bölgelerinde yetiştirilerek kesime gönderilen 1 ay - 3 yaş arasındaki 312 domuz'a ait tonsil örneğinde *Actinobacillus pleuropneumoniae* spesifik DNA'sı, *dsbE* like geninden derive primerler (5'-GATAAACCTTTTCCGGAATT-3' ve 5'-TACCACACCGTGTTTATCAA-3') kullanılarak PCR ile araştırıldı. PCR sonucunda tonsil örneklerinin hiç birinde 342 bp'lik bantlar görülmedi. Örneklerin PCR negatif olarak saptanması, domuz pleuropnömonisinin incelenen işletmelerde bulunmadığını ortaya koyması yönünden sevindiricidir. Bu ve diğer infeksiyöz hastalıklar açısından yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Domuz, *A. pleuropneumoniae*, *dsbE* geni, PCR

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* BY PCR IN PIGS

A. pleuropneumoniae specific DNA in tonsil samples of 1 month to 3 years old pigs raised in different regions and send to slaughterhouses was investigated by PCR using primers (5'-GATAAACCTTTTCCGGAATT-3' and 5'-TACCACACCGTGTTTATCAA-3') derived from *dsbE* like gen.

In neither tonsil sample, 342 bp bands were observed by PCR. Determining the samples as PCR negative is promising that the infection is not present in the investigated farms and further studies should be performed for this and other possible infectious diseases of pigs.

Key words: Swine, *A. pleuropneumoniae*, *dsbE* gen, PCR

Giriş

Actinobacillus pleuropneumoniae'nin neden olduğu domuz pleuropnömonisi dünya çapında büyük ekonomik kayıplara neden olan, solunum güçlüğü ve genç domuzlarda büyüme geriliği ile karakterize ve akut olgularda ölümle sonuçlanan bulaşıcı bir infeksiyöz hastalıktır (Dubreui ve ark., 2000; MacInnes ve Rosendal, 1988).

A. pleuropneumoniae gram negatif, hareketsiz, fakültatif anaerobik, kapsüllü, sporsuz, Pasteurellacea familyasında yer alan pleomorfik bir kokobasildir (Holt ve ark., 1994; Rycroft ve Garside, 2000).

Domuz sürülerinde *A. pleuropneumoniae*'nin tanısı için kültür ve serolojik testler kullanılmakla birlikte PCR'ın oldukça spesifik ve duyarlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir.

(Gram ve ark., 1996; Moral ve ark., 1999; Xiao ve ark., 2006).

Araştırmacılar domuzlardan *A. pleuropneumoniae*'nin izolasyonu amacıyla, tonsil örneklerinden yapılan izolasyonun, nasal svab örneklerinden yapılan izolasyona göre daha fazla olduğunu, bu nedenle tonsil örneklerinin alınmasının daha uygun olacağını belirtmişlerdir (Chiers ve ark., 2002b; Sdibe ve ark., 1993).

Tonpitak ve ark. (2007), Tayland'da 18 çiftlikten toplam 100 hayvana ait tonsil biyopsi örneğini incelediklerini, örneklerden 20 adet *Actinobacillus* spp. izole edildiğini ve yapılan PCR da 10 örnekte *A. pleuropneumoniae*, 10 örnekte ise *A. porcitonisillarum* saptadıklarını bildirmişlerdir.

Gram ve ark. (1996), Danimarka'da dokuz farklı domuz çiftliğinden ait toplam 101 tonsil örneğinden kültürle %23 pozitiflik, PCR ile %65 oranında pozitiflik saptadıklarını rapor etmişlerdir.

Chevallier ve ark. (2000), Fransa'da yaptıkları çalışmada *A. pleuropneumoniae* varlığını PCR ile araştırmışlar ve farklı

yetiştiricilik bakımından %6-22 oranında pozitiflik saptamışlardır.

Çin'de yapılan bir çalışmada ise PCR ile 100 sağlıklı hayvanın 26'sının *A. pleuropneumoniae* pozitif olduğunu bildirmişlerdir (Xiao ve ark., 2006).

Brezilyada PCR ile yapılan bir çalışmada, hasta hayvanlarda %31, sağlıklı hayvanlarda ise %14 oranında *A. pleuropneumoniae* pozitifliği rapor edilmiştir (Da Costa ve ark., 2004).

Bu çalışmada daha önceki bir çalışma (Metiner ve Ak, 2007) kapsamında domuz pleuropnömonisi yönünden bakteriyolojik olarak incelenen ve bir örnekte pozitiflik saptanan domuzlara ait tonsil örneklerinde *A. pleuropneumoniae* spesifik DNA'nın *dsbE*-like geninden derive primerler kullanarak, PCR tekniği ile araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Örnekler

Kesime sevk edilen 1 ay - 3 yaş arasındaki 312 hayvana ait tonsiller kullanıldı. Hayvanların sayısı, alındığı çiftlik, yaşı, cinsiyeti klinik ve kesim sonrası makroskopik bulgular Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Kesime getirilen hayvanlara ait tonsil örneklerinin kaynakları, sayısı, yaşı ve örneğin alındığı hayvanda kesim öncesi ve kesim sonrası saptanan bulgular

Table 1. Origin, number, age, sex, clinical and postmortem findings of the animals

Çiftlik	Yaş	Cinsiyet		Alınan örnek Tonsil örnekleri (n)	Saptanan bulgular	
		♀ (n)	♂ (n)		Klinik bulgular	Kesim sonrası bulgular
Adana	1-3 yıl	12	1	13	a	d
Balıkesir	1-12 ay	2	26	28	a	d
Edirne- Keşan	1-12 ay	3	13	16	a	d
	1-3 yıl	-	1	1		
Erzincan	1-3 yıl	15	4	19	a	d
İstanbul-1	1-12 ay	12	22	34	a	d
	1-3 yıl	37	20	57		
İstanbul-2	1-12 ay	1	2	3	a, b	c
	1-3 yıl	19	5	24		
İstanbul-3	1-12 ay	4	13	17	a	d
İzmir	1-12 ay	19	15	34	a	d
Tekirdağ-Çorlu1	1-12 ay	11	7	18	a	d
Tekirdağ-Çorlu2	1-3 yıl	2	3	5	a	d
Tekirdağ Malkara	1-12 ay	3	27	30	a	d
	1-3 yıl	7	6	13		
Toplam		147	165	312		

a : büyüme geriliği, yeterli kiloya ulaşamama

c : akciğerlerde ödem ve nekroz

a:decrease in weight gain, or weight loss

c:necrotic and haemorrhagic lung lesions

b : topallık

d : makroskopik bir lezyon saptanmadı

b : lameness

d : no macroscopic lesion

DNA ekstraksiyonu ve PCR

DNA ekstraksiyonu QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Cat. No.51306) kullanılarak üretici tavsiyesine göre gerçekleştirildi.

A. pleuropneumoniae Serotip 1, 10, 11, 12 NAD ilaveli PPLO agar' a ekimleri yapılarak elde edilen kültürlerden aynı yöntemle DNA'ları ekstrakte edilerek PCR işlemlerinde pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Spesifik amplifikasyonun sağlanması amacıyla *dsbE* geninden derive primerler (5'-GATAAACCTTTTCCGGAATT-3' ve 5'-TACCACACCGTGTATCAA-3') kullanıldı.

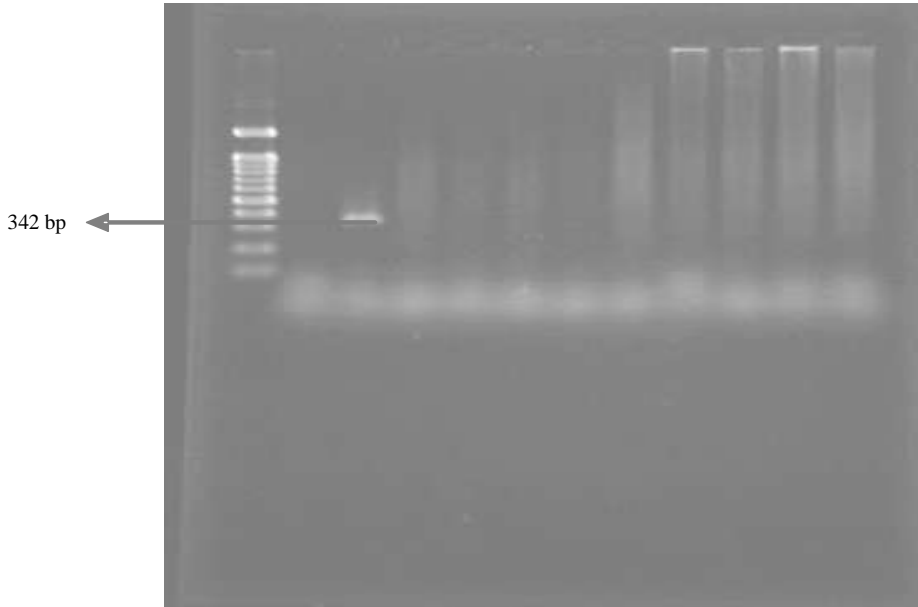
Amplifikasyon için; PCR tüplerine DNA ekstraktından 5µl, her bir primerden 0,4 µM, Taq DNA polimeraz 2,5 U, 1XPCR tamponu (Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 1,5 mM MgCl₂, Ph:7,8) ve her bir dNTP den 200 µM olacak şekilde (Qiagen,Taq PCR Master Mix, kat. No 201 445) 50 µl lik karışımlar hazırlandı, üzeri mineral yağ'la kapatılıp PCR cihazına (Biometra, Uno-Thermoblock) yerleştirildi (Chiers ve ark., 2001).

Örnekler 95 °C de 5dk ön denatürasyona tabi tutuldular. 95 °C de 45 sn denatürasyon, 57 °C de iki dk hibridizasyon , 72 °C de bir dk sentez (toplam 3 siklus) aşamalarını takiben 95 °C de 20 sn denatürasyon 57 °C de bir dk hibridizasyon 72 °C de bir dk sentez (toplam 30 siklus) aşamaları ile gerçekleştirildi. Siklusların sonuna 72 °C de yedi dk son sentez aşaması eklendi (Chiers ve ark., 2001).

Amplifikasyon sonrasında elde edilen PCR ürünleri 100 bp lik DNA marker ile birlikte % 1,5 agaroz jelde (0,5xTBE tampon solusyonda) elektroforetik seperasyona tabi tutuldular.

Bulgular

Daha önceki çalışma kapsamında *A. pleuropneumoniae* serotip 12 izole edilen tonsil örneği de dahil olmak üzere, incelenen 312 tonsil örneğinden gerçekleştirilen PCR sonucunda 342 bp lik bantların oluşmadığı saptandı. Tüm örnekler PCR negatif olarak değerlendirildi. Elektroforez sonucu jel görüntüsü figür 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Elektroforez sonucu tonsil örneklerinin %1,5 lik agaroz jeldeki görüntüsü

Figure 1. Agarose gel (1.5 %) showing PCR products of positive control and negative tonsil samples

M: marker (100 bp); N: negatif kontrol; P: pozitif kontrol (*A. pleuropneumoniae* serotip 12); 1 - 9: incelenen tonsil örnekleri

M: marker(100 bp); N: negative control; P: positive control (*A. pleuropneumoniae* serotip12); 1 - 9: tonsil samples

Tartışma ve Sonuç

Araştırmacılar *A. pleuropneumoniae*'nin izolasyonunda nasal svab ve tonsil örneklerinin kullanıldığını, tonsil örnekleri ile çalışmanın izolasyon şansını daha da artırdığını bildirmişlerdir (Chevallier ve ark., 2000; Chiers ve ark., 2002a; Sdibe ve ark., 1993). PCR tekniği kullanılan bir çalışmada da nasal svab örneklerine göre tonsil örneklerinden belirgin şekilde fazla pozitif sonuç saptandığı rapor edilmiştir (Chiers ve ark., 2001).

Chiers ve ark. (2001), *A. pleuropneumoniae*'nin tanısı için farklı PCR teknikleri kullandıklarını ve *A. pleuropneumoniae*'ya spesifik *dsbE*-PCR sonuçlarının *omlA*-PCR ve *Adiavet*-PCR sonuçlarına göre daha duyarlı ve spesifik bulunduğunu bildirmişlerdir.

Belirtildiği üzere tonsilden pozitiflik oranının yüksek olması nedeniyle bu çalışmada da inceleme örneği olarak tonsiller kullanılmış ve spesifik *dsbE* geninden derive primerler tercih edilmiştir.

Schaller ve ark. (2001), rutin örneklerden kültür ve serolojik tanıyla *A. pleuropneumoniae* olarak saptanan izolatları *apx IV* toksin gen primerleri kullanılarak PCR ile inceledikleri, PCR sonucunda *A. pleuropneumoniae* spesifik DNA'sı yönünden negatif olduklarını belirlediklerini, ancak izolatların 16S rRNA dizi analizleri yapıldığında bunların tanımlanmamış *A. pleuropneumoniae* türlerine ait olduklarını belirtmişlerdir.

Gottschalk ve ark. (2003), izole ettikleri iki *A. pleuropneumoniae* suşunu biyokimyasal ve antijenik olarak serotip 1 ve 9 olarak tanımladıklarını bildirmişler ancak daha sonra bu suşlar ile gerçekleştirdikleri *A. pleuropneumoniae* spesifik PCR testi ile negatif sonuç elde ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları 16S rRNA dizi analizleri sonucunda *A. pleuropneumoniae*'ya fenotipik olarak benzer fakat filogenetik olarak farklı olan bu suşların *Actinobacillus porcitoncillarum* olarak adlandırılmasını önermişlerdir. Bu izolatların deneysel olarak domuzlara inokulasyonundan sonra infeksiyon

oluşturmadıklarını ve apatojen *Actinobacillus* türleri olduklarını belirtmişlerdir.

Da Costa ve ark. (2004), gerçekleştirdikleri bir çalışma kapsamında domuzlardan izole edilerek *A. pleuropneumoniae* olarak sınıflandırılan 29 izolatı *ApX IVA* geninin varlığı yönünden PCR ile incelemiş ve 16 izolatın PCR negatif olduklarını saptamışlardır. Araştırmacılar bu izolatları 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre *A. minor* (11 adet), *A. porcinus* (3 adet) ve *Pasteurella* spp. (2 adet) olarak saptadıklarını rapor etmişlerdir. Biyokimyasal testlerin *A. pleuropneumoniae* izolatlarının çoğunluğu için karakterizasyonda yeterli olmakla birlikte, PCR ve 16S rDNA dizi analizlerinin doğru sınıflandırmadaki önemini vurgulamışlardır.

Çalışmamızda tüm örneklerin PCR negatif olduğu saptanmıştır. Önceki çalışmada (Metiner ve Ak, 2007), biyokimyasal ve antijenik özellikleri yönünden *A. pleuropneumoniae* serotip 12 saptanan tonsil örneğinde de *A. pleuropneumoniae* spesifik DNA'sı saptanmamıştır. Bu sonuç, ekstraksiyon problemleri ya da örneklerdeki olası PCR inhibitör faktörlerinin varlığını akla getirmekle birlikte serotip 12 olduğu düşünülen izolatın ekstraksiyon sonrası yapılan ölçümleri kabul edilebilir sınırlarda olduğu için bu olasılık değerlendirilmemiştir. Bakterinin 16S rRNA geninin 1394 bp uzunluğundaki gen bölgesinin dizi analizi sonucunda *Haemophilus parainfluenzae* suşuna %97, *Terrahaemophilus aramaticivorans* suşuna %97, *Haemophilus pittmaniae* suşuna %96, *A. pleuropneumoniae* suşlarına %95 - 96 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (yayınlanmamış veri). Bundan dolayı, yukarıdaki çalışmalara paralellik gösteren bir sonucun olduğu, izolatın tür düzeyinde saptanan oranların yukarıda belirtilen türler içinde düşük bir oranda olduğu saptanmıştır. İzolatın kullandığımız primerlerle saptayamadığımız *Pasteurellaceae* familyasına ait tanımlanmamış (*Actinobacillus* spp.) bir tür olabileceği, bu varsayımın başka çalışmalar ile de desteklenmesi gerektiği düşünüldü.

Çalışmamızda kullanılan örnekler çiftlik bazında incelendiğinde sadece İstanbul-2

çiftliğinde canlı hayvanlarda topallık, postmortem incelemeleri sonucunda ise akciğerlerde ödem ve nekroz odaklarının olduğu görüldü. Diğer çiftliklerde solunum yolu infeksiyonlarını işaret edecek herhangi bir bulgu görülmedi. Örnek aldığımız çiftliklerin hepsinde yeterli kiloya ulaşamama sorunu mevcuttu. Hayvanlarda görülen semptomların yetersiz beslenme ve olumsuz bakım koşullarına bağlı olabileceği düşünüldü.

İnzana ve ark. (1988), infeksiyonun bulaşmasında kalabalık nakil ve olumsuz hava koşullarının rol alabileceğini bildirmişlerdir. **Levonen (2001)**, özellikle kronik veya gizli infekte domuzların çiftliklere alınması, gizli infekte domuzların burun buruna temas esnasında bulaşmanın direkt olabileceği gibi ayrıca hava yolu ile de bulaşmanın olabileceğini bildirmiştir.

A. pleuropneumoniae'nin PCR ile saptanamaması, yurdumuzdaki domuz yetiştiriciliğinin, küçük çapta az sayıdaki hayvanlarla yapıldığı, (**TÜİK, 2010**) çiftliklerin birbirlerinden uzak mesafelerde olmaları, çiftlikler arası hayvan alış verişi ve hayvan transportunun yok denecek kadar az olmasına bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Araştırmanın sonuçları domuz pleuropnömonisinin incelenen işletmelerde bulunmadığının ortaya koyması yönünden sevindiricidir. Ülkemizde domuz yetiştiriciliğinin artmasına paralel olarak bu konuda özellikle moleküler düzeyde yeni çalışmaların yapılması gereklidir.

Teşekkür

Bu çalışma İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 452/27122005)

Çalışmamızda kullandığımız Referans suşları sağlayan sayın Prof. Dr. Gerald F. GERLACH'a (Hannover Üniversitesi, Veteriner Fakültesi) teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Chevallier, B., Blanchard, B., Keita, A., Pagot, E., Pommier, P., 2000.** Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR: field evaluation. Journées Rech. Porcine en France. 32, 1-6.
- Chiers, K., Done, E., Overbeke, I.V., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., 2002a.** *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. Veterinary Microbiology 85,343-352.
- Chiers, K., Done, E., Overbeke, I.V., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., 2002b.** Evaluation of serology, bacteriological isolation and polymerase chain reaction for the detection of pigs carrying *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the upper respiratory tract after experimental infection. Veterinary Microbiology 88, 385-392.
- Chiers, K., Overbeke, I.V., Done, E., Baele, M., Ducatella, R., Beare, De T., Haesebrouck, F., 2001.** Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in cultures from nasal and tonsillar swabs of pigs by a PCR assay based on the nucleotide sequence of a *dsbE*-like gene. Veterinary Microbiology 83, 147-159.
- Da Costa ,M.M., Klein, S.C.,Balestrin, R., Shrank, A., Piffer I.A., da Silva, S.C., Schrank I.S., 2004.** Evaluation of PCR based on gene *apxIVA* associated with 16S rDNA sequencing for the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and related species. Current Mikrobiology. 48, 189-195
- Dubreuil, J.D., Jacques, M., Mittal, K.R. and Gottschalk, M., 2000.** *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides; their role in diagnosis and immunogenicity. Animal Health Research Reviews 1, 73-93.
- Gottschalk, M., Broes, A., Mittal, K.R., Kobisch, M., Kuhnert, P. Lebrun, A., Frey, J., 2003.** Non-Pathogenic *Actinobacillus* isolates antigenically and biochemically similar to *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a novel species? Veterinary Microbiology 92, 87-101.
- Gram, T., Ahrens, P., Nielsen, J.P., 1996.** Evaluation of PCR for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mixed bacterial cultures from tonsils. Veterinary Microbiology 51, 95-104.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994.** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9. ed. Williams & Wilkins, Baltimore USA, 194 -196, 275 – 277.

- İnzana, T.J., Jianneng, M.A., Workman T., Gogolewski, R.P. and Anderson, P., 1988.** Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infection and Immunity* 56,1880-1889.
- Levonen, K., 2001.** The dedection of respiratory diseases in swine herds by means of antibody assay on colostrum from sows. Academic Dissertation, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Hesinki.
- MacInnes, J.I., Rosendal, S., 1988.** Prevention and kontrolof *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection in swine: a reviw. *The Canadian Veterinary Journal* 29, 572-574.
- Metiner, K., Ak, S., 2007.** Presence and seroprevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs in Turkey. *Acta Veterinaria Brno* 76, 237-244.
- Moral, C.H., Sosano, C., Salazar, M.S., Marcos, J.Y., Ramos, S.S., and Carrasco, G.N., 1999.** Molecular cloning and sequencing of the *aroA* gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its use in a PCR assay for rapid identification. *Journal of Clinical Microbiology* , 37, 1575-1578.
- Rycroft, A.N. and Garside, L.H., 2000.** *Actinobacillus* species and their role in animal disease. *The Veterinary Journal* 159, 18-36.
- Schaller, A., Djordjević, P.S., Eamenens, J.G., Forbes, A.W., Kuhn, R., Kuhnert, P., Gottschalk, M., Nicolet, J., Frey, J., 2001.** Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene *apxIVA*. *Veterinary Microbiology* 79, 47-62.
- Sidibe, M., Messier, S., Lariviere, S., Gottschalk, M. and Mittal, K.R., 1993.** Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological tests. *Canadian Journal of Veterinary Research* 57, 204-208.
- Tonpitak, W., Rohde, J., Gerlach, G.F, 2007.** Prevalence of “*Actinobacillus porcitonisillarum*” in porcine tonsils and development of a diagnosis duplex PCR differentiating between “*Actinobacillus porcitonisillarum*” and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Mikrobiology* 122,157-165
- TÜİK, 2010.** Türkiye hayvansal üretim istatistikleri <http://www.tuik.gov.tr> (Erişim 10.11.2010)
- XIAO Guo-sheng, CAO San- Jie, DUAN LÍ-li, WEN Xin-tian, MaXiao-ping and CHEN Hua mei., 2006.** Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in infected and subclinical infected pigs by multiplex PCR based on the genes *ApXIVA* and *OmlA*. *Agricultural Sciences in China* 5, 146-154.