

# Değişik *Bordetella bronchiseptica* Suşlarında Virulans Faktörleri ve İmmünojenik Özellikler

Özlem BÜYÜKTANIR (\*), Mehmet AKAN (\*\*), Erkan ÖZCENGİZ (\*)

(\*) Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi, Aşı-Serum Üretim ve Araştırma Bölümü, Ankara

(\*\*) Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

## ÖZET

Değişik *Bordetella bronchiseptica* suşlarında virulans faktörleri ve bazı antijenlerin sentezlenme durumları ile suşların immünolojik özelliklerinin araştırıldığı bu çalışmada, patojenitede önemli derecede rolleri olan filamentöz hemagglütinin (FHA), adenilat siklaz hemolizin (AC-Hly), pertaktin, fimbriya (FimD), 36 kDa protein ve fimbriya komponentlerinin *B. bronchiseptica* suşlarında değişik oranlarda sentezlendiği gözlenmiştir. Adenilat siklaz-hemolizin sentezinin suşlarının tamamında yüksek değerlerde (9.2-17.8 AC ünitesi) görülmesi ve üremenin erken döneminde başlaması, bu komponentin *B. bronchiseptica* suşlarının farelerde görülen güçlü letal etkisi ile birinci derecede ilgili olduğunu göstermiştir. Değişik *B. bronchiseptica* suşlarına ait tam hücre aşuları ile bağışıklanan farelerde yüksek titrede ve çapraz reaksiyon veren aglutinin düzeyi olduğu görülmüştür. Bununla uyumlu olarak, bağışık farelerin peritonici patojen bakteri uygulamasına karşı iyi düzeyde (%80-100) korunduğu gözlenmiştir. Bununla beraber, genel olarak *B. bronchiseptica* suşları arasında koruyucu bağışık yanıt oluşturma yönünden yeterli bir çapraz reaksiyon görülmesine karşın, suşlar arasında önemli derecede antijenik farklılıklar bulunduğu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Bordetella*, virulans, immünojenite

## SUMMARY

### Virulence Factors and Immunogenicity of Different *Bordetella bronchiseptica* Strains

Virulence factors of *Bordetella bronchiseptica* strains, synthesis level of some of the antigens and immunogenicity of the strains were investigated. filamentous hemagglutinin (FHA), adenylate cyclase hemolysin (AC-Hly), pertactin, fimbria (FimD), 36 kDa protein and fimbriae components that have major roles in pathogenicity were observed to be synthesized in different quantities by *B. bronchiseptica* strains. Early initiated and high level AC-Hly (9.2-17.8) secretion of the strains showed the first level relationship of AC-Hly synthesis with the strong lethality of *B. bronchiseptica* strains. Besides, high level protection (80-100%) in mice against bacterial challenge was determined in parallel with the high and cross-reacted agglutinin level of the same mice immunized with whole-cell vaccines of the strains. Generally, major antigenic differences among the clinical isolates and strains were observed despite the minimum cross-reaction adequate for protection.

**Key words:** *Bordetella*, virulence, immunogenicity

## GİRİŞ

*Bordetella bronchiseptica*, boğmaca hastalığının etkeni olan *Bordetella pertussis* ile büyük benzerlik gösteren ancak daha çok evcil ve vahşi memeli hayvanlar ile seyrek olarak insanlarda ve özellikle immun yetmezliği olanlarda solunum yolu enfeksiyonları oluşturan bir bakteridir. *B. pertussis*'in nazlı ve zor üreyen bir bakteri ol-

masına karşın, *B. bronchiseptica* kültür ortamında kolay ve hızlı üreme özelliğine sahiptir (1,2). Bununla beraber, *B. bronchiseptica* pertussis toksin (PT) dışında, *B. pertussis* ile benzer virulans faktörlerine sahip olup bu faktörler başlıca adenilat siklaz hemolizin (AC-Hly), dermonekrotik toksin (DNT), filamentöz hemagglütinin (FHA), pertaktin, fimbriyalar ve dış membran porin proteinleridir (2). Adenilat siklaz-hemolizin (AC-Hly), hemolitik ve sitotoksik aktiviteye sahip, ökaryotik hücrelerde kalmodulin ile aktive olarak

**İletişim:** Erkan Özcengiz

**e-posta:** erozcengiz@yahoo.com

hücre içi siklik AMP (cAMP)'nin artmasını sağlayan bir proteindir (3, 4). FHA, fimbriya ve pertaktin komponentleri bakterinin solunum yolu epiteline bağlanmasını ve kolonize olmasını sağlayan faktörlerdir. Bunların yanında 40 kDa molekül ağırlığına sahip ve Fim D olarak adlandırılan minör fimbriyal alt birim ve virulans ile ilgili dış membran proteinlerinin de bulunduğu gösterilmiştir (5-8).

Bu çalışmada, değişik orijinli *B. bronchiseptica* suşlarında yukarıda belirtilen virulans faktörleri ve bazı antijenlerin sentezlenme durumları ile suşların immünolojik ve antijenik özellikleri araştırıldı.

## MATERYAL VE YÖNTEM

**Bakteri Suşları.** Bu çalışmada, *B. bronchiseptica* F415 köpek suşu Dr. Tony Hurt, Liverpool Üniversitesi İngiltere'den, *B. bronchiseptica* 219 köpek suşu ve *B. bronchiseptica* 3036 kobay suşu Goetheborg Üniversitesi Kültür Koleksiyonu İsveç'ten, 4617 ATCC suşu Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Kültür Koleksiyonu Laboratuvarı'ndan, CA, ÜK2, ÜK3, ÜK4, ÜK6, ÜK7, ÜK8, ÜK11, ÜK14, B51 ve B63 izolatları Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Suşlar biyokimyasal ve antijenik olarak yeniden tanımlandıktan sonra (9), modifiye Cohen-Wheeler katı besiyerinde (10) üretilmiş ve SIV1 besiyeri ile süspanse edilerek, stok kültür olarak % 50 gliserol içerisinde -80°C'de saklanmıştır. *B. pertussis* Saadet, Nursel ve Tohama suşları Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi, Aşı-Serum Üretim ve Araştırma Bölümü'nden temin edilmiştir.

**Deney Hayvanları.** Bağışıklama çalışmalarında kullanılan Swiss-albino fareler ve kobaylar Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi, Aşı-Serum Üretim ve Araştırma Bölümü, Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

**Kültür.** *B. bronchiseptica* suşlarına ait kültürler, katı Bordet-Gengou ve modifiye Cohen-Wheeler

besiyerleri ile Sıvı Modifiye Morse-Bray, Stainer-Scholte ve CL (betacyclo-dextrin) besiyerlerinde 37°C'de yapılmıştır (10-14).

**Hemaglutinasyon (HA) aktivitesi tayini.** CL besiyeri sıvı kültürleri 12 000 rpm'de 30 dakika +4°C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant örnekleri U tabanlı mikropleytde ilk çukura 50 µl konularak PBS ile seri dilasyonları yapılmıştır. Üzerine, PBS ile 3 defa yıkanan kanatlı eritrositlerinin % 0,5'lik süspanسیونundan 50 µl ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında bir saat bekletildikten sonra en son hemaglutinasyon görülen çukur HA titresini olarak kaydedilmiştir. Hemaglutinasyon pozitifliği kültürdeki filamentöz Wz hemaglutinin (FHA) varlığını göstermiştir (15).

**Hemolitik aktivite (AC-Hly) tayini.** Bakteri adenilat siklaz-hemolizin (AC-Hly)'e ait hemolitik aktivite, Rogel ve ark.(16) yöntemi ile tayin edilmiştir. Testte koyun eritrositlerinin TBS tamponu (0,145 M NaCl, 0,005 M dekstroz, 0,002 M CaCl<sub>2</sub> ve 0,01 M Tris, pH:7,4) ile hazırlanan % 1'lik çözeltisi kullanılmıştır. Bakteri sıvı kültürü 12 000 rpm'de 30 dakika +4°C'de santrifüj edilmiş ve 1ml süpernatant üzerine eşit hacimde koyun eritrositleri ilave edilerek karıştırılmıştır. Karışım, 37°C'de 18 saat bekletildikten sonra 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek eritrositler çöktürülmüştür. Örnek süpernatantın 541nm'de absorbans değerinin negatif kontrol değerine oranı AC ünitesi olarak kaydedilmiştir. Testte pozitif kontrol olarak distile su, negatif kontrol olarak da CL besiyeri kullanılmıştır.

**Suşların Elektroforetik Analizi.** Çalışmada kullanılan suşlara ait bakteri lizat proteinleri, sodyum dodesil sülfatpoliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)'nde Laemmli (17) yöntemi ile incelenmiştir. Ayırma jeli % 12,5, dizici jel % 4,5 olarak hazırlanmıştır. Bakteri hücre örnekleri, elektroforez uygulamasından önce, örnek tamponu (500 µl hacmi; 200 µl % 50'lik gliserol, 100 µl 1 M Tris, 100 µl % 10'luk SDS, 50 µl % 0,1'lik bromfenol mavisi ve 50 µl DTT (Ditiyo-treitol) içerir) ile 1:1 oranında karıştırılmıştır. Örnekler jele uygulanmadan önce 2 dakika kayna-

tilmiştir. Güç kaynağı başlangıçta 200 V, örnekler ayırıcı jele girdikten sonra ise 250 V olacak şekilde ayarlanmıştır. Jel gümüş nitrat yöntemi ile boyandı. Uygulamada geniş dağılımlı molekül ağırlık standartları kullanılmıştır.

**Jel Filtrasyon Kromatografisi.** Suşlara ait ekstrakte proteinler, Irons'ın (18) üre-ısı ekstraksiyon yöntemi modifiye edilerek ekstrakt %30 (w/v) bakteri süspansiyonundan hazırlanmıştır. 10 mM Tris, 0.145 M NaCl, pH 7.2 (TSA) tamponu ile dengelenen Bio Pilot (Pharmacia) Superdex 75 jel filtrasyon kolonuna (26x600 mm) yüksek basınçta uygulanarak kromatogramları belirlenmiştir.

**Bağışıklık.** Her suşa ait bakteri süspansiyonu 56°C'de inaktive edilerek 15 OU/ doz olarak hazırlanan tam hücre deneysel aşılarda fareler 15 gün ara ile iki defa peritonici enjeksiyonla bağışıklanmıştır. İkinci enjeksiyondan 15 gün sonra kuyruk venalarından kan alınan hayvanların bir grubuna bir gün sonra peritonici enjeksiyonla LD<sub>50</sub> (Letal Doz<sub>50</sub> değeri = 0.5 OU canlı bakteri süspan-

siyonu olarak belirlenmiştir) ve diğer grubuna 4LD<sub>50</sub> canlı bakteri uygulanmıştır. Bir hafta boyunca fareler gözlenerek ölümler kaydedilmiştir. Bağışık hayvanlardan alınan kan serumlarında mikroaglutinasyon yöntemiyle (18) aglutinin titreleri belirlenmiştir. Ayrıca başka bir grup fareye 15 gün arayla 3 enjeksiyon yapılarak aglutinin titre yükseliği kaydedilmiştir.

## BULGULAR

Araştırmada kullanılan tüm suşların benzer morfolojik ve biyokimyasal tür özelliklerine sahip olduğu ve aynı zamanda standart suş *Bordetella bronchiseptica* F415 antiserumu ve *Bordetella pertussis* Saadet antiserumu ile pozitif lam aglutinasyonu verdiği tespit edilmiştir.

**Hemaglutinasyon (HA) Aktivitesi.** HA aktivitesinin, CL besiyerinde üremenin 24 ve 42'nci saatlerinde başlayarak, 72-90'nci saatlere kadar görülebildiği belirlenmiştir (Tablo 1). Araştırılan 15 suşun 12'sinde (%80) (F415, ÜK2, ÜK3, ÜK4, ÜK6, ÜK7, ÜK8,

Tablo 1. *B. Bronchiseptica* suşlarının CL besiyerinde üreme ve HA aktivitesi.

Suşlar	18. saat		24. saat		42. saat		48. saat		66. saat		72. saat		90. saat	
	A630	HA	A630	HA	A630	HA	A630	HA	A630	HA	A630	HA	A630	HA
F415	0,123	(-)	0,514	(-)	1,804	1/2	1,906	1/2	2,344	1/4	2,491	1/4	2,748	1/8
219	0,279	(-)	0,694	(-)	1,647	(-)	1,753	(-)	2,086	(-)	2,390	(-)	2,539	(-)
CA	0,131	(-)	0,555	(-)	1,645	(-)	1,747	(-)	2,057	(-)	2,307	(-)	2,481	(-)
ÜK2	0,182	(-)	0,424	1/2	1,482	1/8	1,680	1/2	2,135	1/2	2,407	1/2	2,653	1/2
ÜK3	0,100	(-)	0,274	(-)	1,361	1/4	1,449	1/2	1,871	1/2	2,130	1/2	2,430	1/2
ÜK4	0,122	(-)	0,366	(-)	1,299	1/2	1,473	1/2	1,863	1/4	2,115	1/2	2,508	1/2
ÜK6	0,130	(-)	0,391	(-)	1,385	1/2	1,458	1/2	2,150	1/2	2,369	1/2	2,650	1/2
ÜK7	0,130	(-)	0,401	1/2	1,248	1/2	1,252	1/2	1,720	1/4	2,078	1/4	2,367	1/8
ÜK8	0,115	(-)	0,358	1/2	1,392	1/2	1,477	1/2	1,632	1/4	2,008	1/4	2,176	1/8
ÜK11	0,178	(-)	0,368	(-)	1,630	1/2	1,739	1/2	2,027	1/2	2,276	1/2	2,443	1/8
ÜK14	0,151	(-)	0,408	(-)	1,278	1/2	1,432	1/2	2,061	1/2	2,297	1/4	2,515	1/8
B51	0,204	(-)	0,464	(-)	1,719	1/4	1,795	1/2	2,210	1/2	2,407	1/2	2,665	1/2
B63	0,526	(-)	0,945	(-)	1,805	(-)	1,940	(-)	2,218	(-)	2,355	(-)	2,516	(-)
4617	0,149	(-)	0,789	(-)	1,556	1/2	1,694	1/2	1,748	1/2	2,329	1/4	2,448	1/2
3036	0,308	(-)	0,658	(-)	1,512	1/2	1,715	1/8	1,834	1/4	2,108	1/2	2,363	(-)

ÜK11, ÜK14, B51, 4617, 3036) FHA sentezinin 1:2-1:8 gibi düşük titrelere olduğu gözlenmiştir. 219, CA ve B63 suşlarında ise

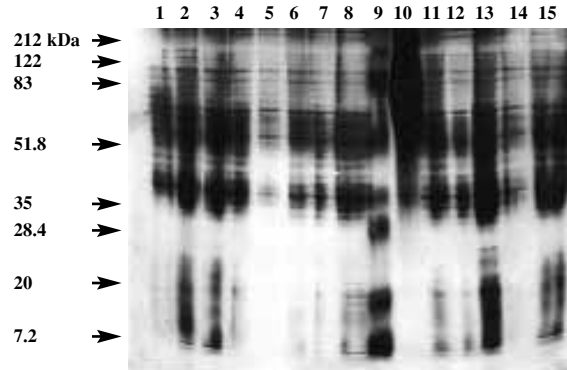
Tablo 2. *B. bronchiseptica* suşlarının CL besiyerinde adenilat siklaz sentez miktarları.

Suşlar	AC-Hemolitik aktivite (U)	AC-Hemolitik aktivite (U)	AC-Hemolitik aktivite (U)	AC-Hemolitik aktivite (U)	AC-Hemolitik aktivite (U)
	18. saat	24. saat	42. saat	48. saat	66. saat
F415	8,7	14,9	15,7	17,4	10,2
219	5,3	9,6	12,4	10,4	7,7
CA	2,4	11,2	16,4	11,5	8,4
ÜK2	7,8	4,2	11,1	9,9	7,1
ÜK3	8,8	4,3	10,2	11,9	11,5
ÜK4	6,8	7,2	10,3	14,2	10,9
ÜK6	5,8	8,5	12,7	14,6	13,1
ÜK7	7,9	11,5	12,9	17,8	13,8
ÜK8	6,1	6,9	11,4	17,7	8,1
ÜK11	5,3	5,6	11,0	11,6	10,2
ÜK14	7,3	9	10,1	11,6	10,2
B51	3,4	11,5	14,2	12,8	12,3
B63	10	9,6	7,7	17,2	16,3
4617	2,6	3,7	7,2	14	13,2
3036	4,8	6,84	7,4	9,2	8,54

herhangi bir aktivite görülemediği (Tablo 1).

**Hemolitik Aktivite (adenilat siklaz-hemolizin; AC-Hly).** Çalışmada kullanılan suşların tamamında AC-Hly aktivitesinin yüksek olduğu ve aktivitenin genel olarak kültürlerin 42 ve 48'nci saatlerinde en üst düzeye ulaştığı gözlenmiştir. F415, CA, ÜK4, ÜK6, ÜK7, ÜK8, B51 ve B63 suşlarının diğerlerine göre daha yüksek aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Tablo 2).

**Suşların Elektroforetik Analizi.** Bakteri lizatının SDS-PAGE profil analizinde suşların çoğunda bakteriye ait belirgin başlıca şu protein bandları gözlenmiştir: 200 kDa civarında FHA ve AC-Hly proteinleri; 83 kDa civarında iki protein bandı; 68 kDa'da pertaktin protein bandı; 51,8 kDa civarında benzer bandlar ve 36 kDa protein (dış membran porin protein) bandı görülmüş-



Şekil 1. *B. bronchiseptica* suşları hücre lizatlarının %10 SDS-PAGE analizi.

tür. 21, 22 ve 24 kDa civarında yer alan Fim 1, 2, 3 proteinlerinin suşlara göre değişiklik gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 1).

**Jel Filtrasyon Kromatografisi.** Suşlara ait üre-ısı ekstrakte proteinlerin Süperdex 200 jel filtrasyon kromatografilerinde başlıca üç protein piki görülmüştür. Kromatogramlar birbirine benzer olmak-

Tablo 3. Tam hücre *B. bronchiseptica* suşları ile bağışklanan farelerde peritonici F415 uygulamasına karşı korunma.

Suşlar	Uygulama Doz (LD <sub>50</sub> )	Korunma	Uygulama Doz (4LD <sub>50</sub> )	Korunma
	Canlı/Toplam	%	Canlı/Toplam	%
F415	5/5	100	5/5	100
4617	5/5	100	2/5	40
CA	5/5	100	5/5	100
219	4/5	80	4/5	80
3036	5/5	100	5/5	100
ÜK2	5/5	100	4/5	80
ÜK3	5/5	100	5/5	100
ÜK4	5/5	100	5/5	100
ÜK6	5/5	100	5/5	100
ÜK7	5/5	100	5/5	100
ÜK8	5/5	100	5/5	100
ÜK11	5/5	100	5/5	100
ÜK14	4/5	80	4/5	80
B51	5/5	100	4/5	80
B63	5/5	100	5/5	100
Kontrol	2/5	40	0/5	0

la beraber, protein piklerinde suşlar arasında oransal farklılıklar bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 2).

**Bağışıklık.** Her suştan hazırlanan tam hücre aşılı ile bağışıklanan farelerin, F415 suşu LD<sub>50</sub> ve 4 LD<sub>50</sub> uygulamasına karşı genel olarak iyi düzeyde korunduğu görülmüştür (Tablo 3). F415, CA, 3036, ÜK3, ÜK4, ÜK6, ÜK7, ÜK8, ÜK11 ve B63 suşları ile bağışıklanan farelerin 4LD<sub>50</sub> uygulamaya karşı da %100 korundukları, 219, ÜK2, ÜK14 ve B51 suşları ile bağışıklanan farelerin ise %80 oranında korunduğu gözlenmiştir. 4617 suşunun fareleri LD<sub>50</sub> uygulamaya karşı %100 korumasına rağmen, 4LD<sub>50</sub>'ye karşı ancak % 40 gibi düşük bir oranda koruduğu belirlenmiştir.

Bağışık farelerden canlı bakteri uygulaması öncesi alınan serum örneklerinde, F415, 4617, ÜK2, ÜK3, ÜK4, ÜK6, ÜK7, ÜK8, ÜK11, B51 ve 3036 suşlarına ait serumların kendi antijenleriyle yüksek titrede mikroaglutinasyon verdiği (1/2048-1/32768), bununla birlikte ÜK14 ve B63

**Tablo 4. *B. bronchiseptica* suşlarına ait bağışık serumların kendi antijenleri ve *B. pertussis* Saadet ve Tohama antijenleri ile mikroaglutinasyon titreleri (x10-1).**

Bağışık Serumlar	Antijen	Antijen	Antijen
	<i>B. bronchiseptica</i> (kendi tam hücresi)	<i>B. pertussis</i> Saadet (tam hücre)	<i>B. pertussis</i> Tohama (tam hücre)
Anti-F415	16384	1024	1024
Anti-4617	8192	256	256
Anti-219	2048	128	32
Anti-CA	2048	256	256
Anti-ÜK2	32768	2048	4096
Anti-ÜK3	32768	128	2048
Anti-ÜK4	32768	2048	512
Anti-ÜK6	8192	2048	512
Anti-ÜK7	32768	1024	256
Anti-ÜK8	32768	4096	1024
Anti-ÜK11	16384	1024	1024
Anti-ÜK14	128	1024	512
Anti-B51	32768	2048	1024
Anti-B63	64	1024	512
Anti-3036	32768	2048	1024

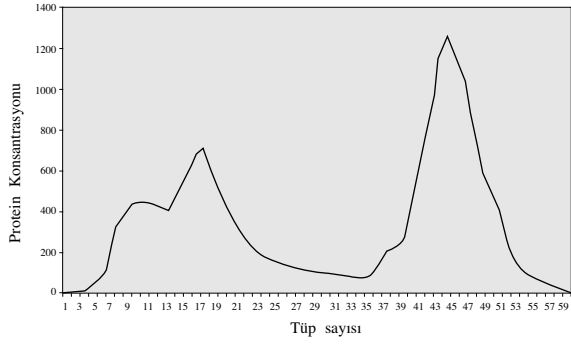
**Tablo 5. *B. bronchiseptica* suşlarının anti-F415 serumu ile mikroaglutinasyon titreleri (x10-1).**

Tam Hücre Antijenler	Anti-F415 serumu ile titre
F415	16384
4617	512
219	512
CA	1024
ÜK2	4096
ÜK3	4096
ÜK4	8192
ÜK6	4096
ÜK7	4096
ÜK8	8192
ÜK11	16384
ÜK14	4096
B51	16384
B63	Negatif
3036	16384

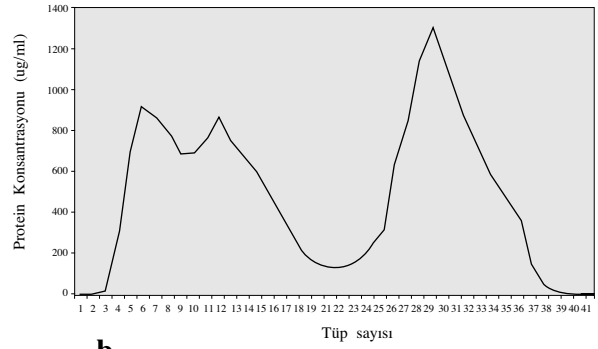
**Tablo 6. *B. bronchiseptica* F415 antijeni ile diğer suşlara ait bağışık (iki enjeksiyon) ve hiperimmün (üç enjeksiyon) serumların mikroaglutinasyon titreleri (x10-1).**

Bağışık ve hiperimmün serumlar	İki enjeksiyon sonrası titre	Üç enjeksiyon sonrası titre
Anti-F415	2048	16384
Anti-4617	32	256
Anti-219	Negatif	64
Anti-CA	2048	8192
Anti-ÜK2	2048	4096
Anti-ÜK3	512	2048
Anti-ÜK4	512	1024
Anti-ÜK6	512	8192
Anti-ÜK7	512	4096
Anti-ÜK8	512	8192
Anti-ÜK11	512	512
Anti-ÜK14	1024	4096
Anti-B51	512	2048
Anti-B63	256	1024
Anti-3036	2048	8192

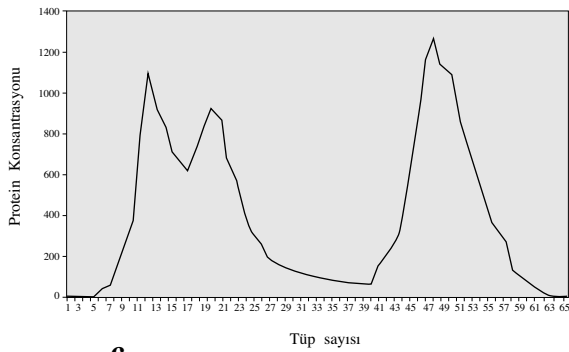
suşlarına ait serumların kendi antijenleriyle düşük titrede (1/64-1/128) aglutinasyon oluşturduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda anti-*B. bronchiseptica* serumlarının *B. pertussis* antijenleri ile de önem-



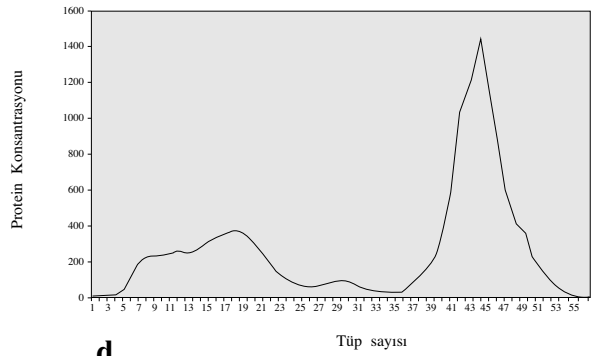
**a**



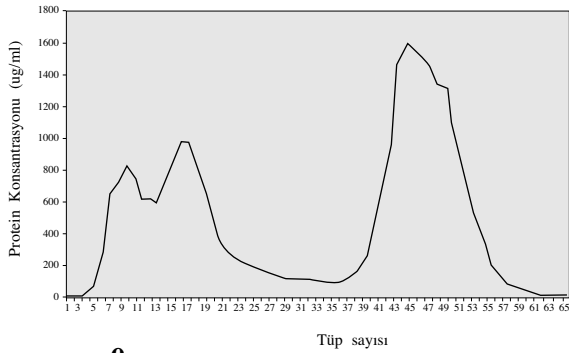
**b**



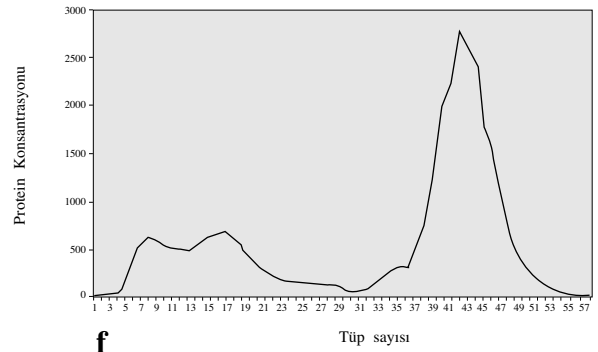
**c**



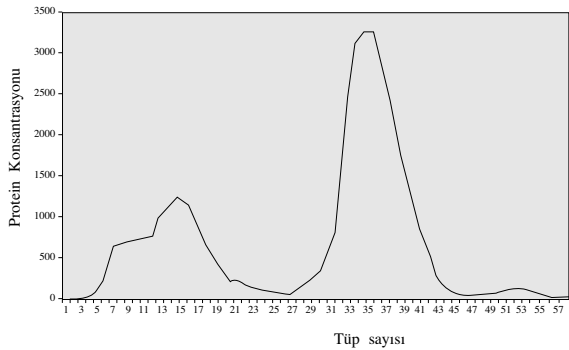
**d**



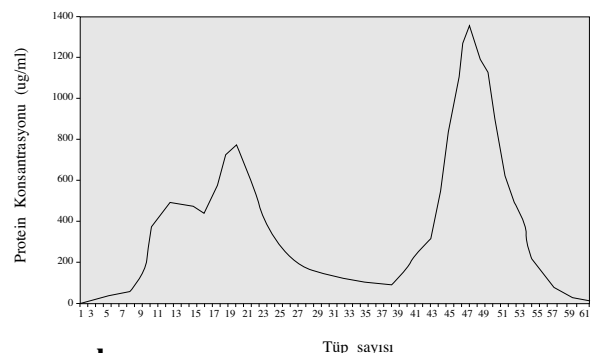
**e**



**f**



**g**



**h**

Şekil 2. *B. bronchiseptica* suşlarında jel filtrasyon kromatogramı: a) F415 b) UK7 c) CA d) 219 e) 4617 f) 3036 g) UK6 h) UK8

li titrelerde reaksiyon verdikleri gözlenmekle beraber, iki tür arasındaki farklılık anlamlı görülmüştür (Tablo 4).

*B. bronchiseptica* bağışıklamalarının değerlendirilmesinde patojen canlı bakteri olarak kullanılan F415 suşu ile diğer suşlar arasındaki immünojenik ilişki Tablo 5 ve 6'da görülmektedir. Tüm suşların anti-F 415 serumu ile verdikleri reaksiyonda farklılıklar bulunmakla beraber genel olarak yüksek titrede aglutinasyon gösterdikleri gözlenmiştir (Tablo 5). Tüm suşlara ait iki ve üç enjeksiyon ile bağışıklanan farelerden elde edilen antiserumların da F415 antijeni ile yüksek titrede reaksiyon vermekle beraber aralarında önemli farklar bulunduğu gözlenmiştir (Tablo 6).

## TARTIŞMA

*B. bronchiseptica* suşlarının üreme özellikleri MMB, SS ve CL sıvı besiyerlerinde incelendiği zaman, log fazına 18'nci saatte ulaştığı ve 42'nci saate kadar bu fazda devam ettiği görülmüştür. Çalışmamızda 15 suştan 12'sinin, sıvı kültürde, *Bordetella* cinsinin patojeniteden sorumlu en önemli komponentlerinden olan filamentöz hemaglutinin (FHA) proteinini sentezlemeye geç log fazında başladığı ve durağan dönemde devam ettiği, bununla beraber FHA sentezinin oldukça zayıf olduğu saptanmıştır (1:2 - 1: 8 HA aktivitesi) (Tablo 1). 219, CA ve B63 gibi bazı suşlarda ise aktivitenin hiç tespit edilememesi ve FHA'nın genel olarak düşük miktarlarda sentezlenmesi, *B. bronchiseptica*'yı *B. pertussis*'den ayıran önemli özelliklerden biri olarak gözlenmiştir. FHA'nın düşük düzeyde sentezlenmesine, farklı *B. bronchiseptica* suşları ile çalışan Jacob-Dubuisson ve ark., (19) tarafından da işaret edilmiştir. Çalışmamızda aynı zamanda FHA sentezinin besiyeri özelliklerine de bağlı olduğu gözlenmiş ve sentetik Stainer-Scholte ve yarı sentetik MMB besiyerlerinde iyi üreme görülmesine karşın Stainer-Scholte besiyerinde HA aktivitesi gösterilememiştir. FHA varlığının beta-siklodekstrin içeren CL-besiyerinde ise MMB besiyerinden daha yüksek düzeyde bulunduğu be-

lirlenmiştir. Tüm suşlar ve klinik izolatlarla ait olan FHA sentezi ile ilgili bulgular, Keil ve Fenwick, 1998 (20) ve Suzuki ve ark., 1985 (13)'nün çalışmaları ile uyumlu görülmüştür.

*B. bronchiseptica* patojenitesinden sorumlu diğer önemli komponent olan adenilat siklaz hemolizin (AC-Hly) proteininin ise tüm suşlarda yüksek oranda ve erken log fazında sentezlendiği gözlenmiştir. AC-Hly aktivitesinin 42-48'nci saatlerde en yüksek değere (9,2-17,8 AC ünitesi) ulaştığı belirlenmiştir. Bu durum, *B. bronchiseptica* suşlarının farelerde oluşturduğu kuvvetli letal etkinin AC-Hly'in yüksek düzeyde sentezlenmesine bağlı olduğunu göstermektedir.

*B. bronchiseptica* suşlarında FHA'nın düşük düzeyde sentezlenmesi, bakteri kolonizasyonunda dış membran proteinleri ile fimbriya proteinlerinin daha önemli olduğunu düşündürmektedir. Bununla beraber, *B. bronchiseptica* suşları ve klinik izolatlarının hücre lizat protein profilinin SDS-PAGE incelemesinde (Şekil 1); suşların çoğunda bağışıklıkta önemli olduğu bilinen FHA, AC-Hly, pertaktin, 40 kDa FimD, 38 kDa dış membran porin proteini, 36 kDa protein ve fimbriya gibi proteinlerin ana bantlar olarak görülmesi ise, FHA molekülünün hücre dışında olduğu gibi hücre yüzeyinde de az miktarda bulunduğunu ve adezyona katkı verdiğini göstermiştir. Bu durum, Gueirard ve Guiso (21)'nün çalışmalarında, *B. bronchiseptica* suşlarının adenilat siklaz-hemolizin, FHA ve pertaktin (dış membran protein) sentezleme yetenekleri ve enfekte farelerin serumlarında anti-adenilat siklaz-hemolizin ve antiFHA antikorlarının erken dönemde oluştuğunun gösterilmesi ile de uyumlu görüldü. Bağışıklama çalışmalarımızda görülen yüksek aglutinasyon titrelerinin ise FHA dışındaki yüzey komponentlerinin bağışık yanıtta oldukça önemli olduğunu göstermektedir. Tam hücre aşısı ile bağışıklanan farelerde F415 suşu ile LD50 ve 4LD50 challenge'a karşı genel olarak iyi düzeyde (% 80-100) korunma sağlanması da suşlar arasında çapraz koruma özelliklerinin başlıca bu

komponentlerle ilgi olacağını gösterdi. Bu durum, her suşa ait tam hücre antijeninin, anti-F415 serumu ile verdiği çapraz aglutinasyon titresinde genel olarak yüksek değerler görülmesi ile de uyumlu olarak değerlendirildi. Bununla beraber çapraz aglutinin reaksiyonlarındaki farklılıklar, antijenik farklılıkları da göstermektedir. Bu antijenik farklılıkların oluşumunda, *B. bronchiseptica* suşları üre-ısı ekstrakte proteinlerinin jel filtrasyon kromatogramlarındaki benzer yapıya karşın suşlar arasındaki protein piklerinde gözlenen oransal farklılıkların da etkili olabileceğini düşündürdü (Şekil 2).

Sonuç olarak, *B. bronchiseptica* klinik izolatlarında, toksisiteden büyük oranda sorumlu olan adenilat siklazın yüksek düzeyde sentezlenmesinin yanında, koruyucu bağışık yanıt oluşturan komponentler bakımından yeterli bir homolojinin genel olarak mevcut olduğu belirlendi. Çalışmamızda bunu sağlayan komponentlerin büyük oranda fimbriya ve diğer yüzey yapıları olduğu, bununla beraber suşlar arasında antijenik farklılıkların da önemli olduğu gözlemlendi.

#### KAYNAKLAR

1. Bemis DA, Greisen HA, Appel MJG: Pathogenesis of canine Bordetellosis. J Infect Dis 135: 753 (1977).
2. Goodnow RA: Biology of Bordetella bronchiseptica. Microbiol Rev 44: 722 (1980).
3. Sakamoto H, Bellalou J, Sebo P, Ladant D: Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin, structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. J Bio Chem 267: 13598 (1992).
4. Leusch MS, Paulaitis S, Friedman RL: Adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis: Production, purification, and partial characterization. Infect Immun 58: 3621 (1990).
5. Cotter PA, Yuk MR, Mattoo S, et al: Filamentous hemagglutinin of Bordetella bronchiseptica is required for efficient establishment of tracheal colonization. Infect Immun 66: 5921 (1998).
6. Mattoo S, Miller JF, Cotter P A: Role of Bordetella bronchiseptica fimbriae in tracheal colonization and development of a humoral immune response. Infect Immun 68: 2024 (2000).
7. Kobisch M, Novotny N: Identification of a 68-kilodalton outer membrane protein as the major protective antigen of Bordetella bronchiseptica by using specific-pathogen-free piglets. Infect Immun 58: 352 (1990).
8. Willems R, Geuijen C, van der Heide HGJ, et al: Isolation of a putative fimbrial adhesin from Bordetella pertussis and the identification of its gene. Mol Microbiol 9: 623 (1993).
9. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, et al: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins, Ninth Edition (1996).
10. Powell HM: Charcoal agar culture medium for preparing H. pertussis vaccine. Bul Hlth Rep 66: 346 (1951).
11. WHO: BLG/UNDP/77.3 Rev. 1. Manual for the production and control of vaccines, pertussis vaccine. (1977).
12. Stainer DW, Scholte MJ: A simple chemically defined medium for the production of phase-I Bordetella pertussis. J. Gen Microbiol 63: 211 (1971).
13. Suzuki Y, Imaizumi A, Ginnaga A et al: Effect of heptakis (2,6-Dimethyl) beta-cyclodextrin on cell growth and the production of pertussis toxin and filamentous hemagglutinin in Bordetella pertussis. Develop. Biol. Standard 61: 89 (1985).
14. Özcengiz E, Günalp A: Bordetella pertussis ekzotoksinlerinden lenfositosis-promoting faktör (LPF) ve filamentöz hemagglutinin (FHA)'nın değişik sıvı besiyerlerinde sentez miktarı. Doğa- Tr J Med Sci 14: 307 (1990).
15. Irons LI, MacLennann AP: Isolation of the lymphocytosis - promoting factor haemagglutinin of Bordetella pertussis by affinity chromatography. Biochim Biophys Acta 580: 175 (1979).
16. Rogel A, Meller R, Hanski E: Adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis, the relationship between induction of cAMP and hemolysis. J Bio Chem 266: 3154 (1991).
17. Laemmler UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London). 227: 680 (1970).
18. Irons LI, Ashworth LAE, Robinson A: Release and purification of fimbriae from Bordetella pertussis. Develop. Biol Standard 61: 153 (1985).
19. Jacob-Dubuisson F, Kehoe B, Willery E: Molecular characterization of Bordetella bronchiseptica filamentous haemagglutinin and its secretion machinery. Microbiol 146: 1211 (2000).
20. Keil DJ, Fenwick B: Strain and growth condition-dependent variability in outer membrane protein expression by Bordetella bronchiseptica isolates from dogs. AJVR 60: 1016 (1998).
21. Gueirard P, Guiso N: Virulence of Bordetella bronchiseptica: Role of adenylate cyclase-hemolysin. Infect Immun 61: 4072 (1993).