

Mannheimia haemolytica suşlarının farklı besiyerlerinde üreme ve lökotoxin oluşturma özelliklerinin incelenmesi

Investigations on growth and leukotoxin production of *Mannheimia haemolytica* strains growing in different culture media

ÖZET

Mannheimia haemolytica hayvanlarda pnömoniye sebebiyet veren en etkili bakterilerden biridir. Etkenin en önemli virülans faktörü olan lökotoksine karşı gelişen antikorlar, hastalığa karşı dirençte önemli bir rol oynarlar. Bu nedenle aşılama çalışmalarında uygun miktarda lökotoxin üretecek suşun ve besiyerinin seçimi önemlidir. Bu amaçla, çalışmada 4 ayrı besiyeri ve 4 ayrı suş test edildi. Test edilen besiyerlerinde canlılık sayımı bakımından RPMI besiyeri diğer test edilen besiyerlerinden önemli derecede farklı bulundu ($P<0.001$). Öbür taraftan BHIB, BHIB+ %5 serum ve BHIB+%1 yeast extract besiyerleri canlılık sayımı açısından birbirlerinden istatistiki olarak farklı bulunmadı ($P>0.05$). Ancak, test edilen suşların tümünün 24 saatlik kültürleri en fazla canlılık sayımını BHIB + %5 at serumu içeren besiyerinde gösterdiler. Suşlar arasında bakteriyel sayıma ilişkin istatistiki olarak önemli bir fark saptanmadı ($P>0.05$).

RPMI besiyeri üretilen lökotoxin açısından diğer besiyerlerine göre istatistiki olarak önemli derecede farklı bulundu ($P<0.001$). Tüm test suşları RPMI besiyerinde diğer 3 besiyerine göre çok daha fazla miktarda lökotoxin üretti. Alınan sonuçlara göre, MH05 suşu en yüksek miktarda lökotoxin üretti ve bunu MH06 suşunun izlediği belirlendi. MH04 ve MH03 suşları arasında bu yönden anlamlı bir farklılık saptanmadı. Test edilen kültür besiyerlerinde üreyen mikroorganizma sayısı ile üretilen lökotoxin arasında bir korelasyon olmayacağı düşünüldü. Sonuç olarak, açlık ve kısıtlı demir varlığı gibi stres faktörlerinin *Mannheimia haemolytica*'nın daha fazla lökotoxin ve muhtemelen diğer virülans faktörleri üretmesine yol açtığı kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Mannheimia haemolytica*, pnömoni, lökotoxin, virülans.

ABSTRACT

Mannheimia haemolytica is one of the most effective bacteria causing pneumonia in animals. Since antibodies against leukotoxin, which is the most important virulence factor of the agent, play an important role in resistance to disease, selection of strain and medium that produce leukotoxin is most important in vaccination studies. For this purpose, 4 different strains were tested in 4 different culture media tested in the study. Based on the viability counts in tested media, RPMI media was found significantly different from the rest of media ($P<0.001$). On the other hand, BHIB, BHIB+5% serum and BHIB+%1 Yeast extract media were not found statistically different from each other's ($P>0.05$) for the viability counts. However, the viability counts measured after 24 hours of culture of tested strains were found to be highest in medium containing BHIB + 5% horse serum. There were no significant differences among strains related to bacterial counts in tested media ($P>0.05$). RPMI media was significantly different from the rest of media regarding to amount of produced leukotoxin in direct ELISA ($P<0.001$). All the strains produced more leukotoxins in RPMI media compared to other 3 tested media.

According to our results, the strain MH05 produced the highest amount of leukotoxin followed by MH06. There was no significant difference between MH03 and MH04 strains in this regard. It was thought that there could be negative correlation between viability count of the bacteria and the produced leukotoxin amount in tested media. As conclusion, it was assumed that stress factors like starvation or iron restriction might cause *Mannheimia haemolytica* to produce more leukotoxin and possibly other virulence factors.

Keywords: *Mannheimia haemolytica*, pneumonia, leukotoxin, virulence.

How to cite this article

Çelik, M., Erdenliğ Gürbilek, S. (2020). *Mannheimia haemolytica* suşlarının farklı besiyerlerinde üreme ve lökotoxin oluşturma özelliklerinin incelenmesi *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*. 5(2): 33-42. <https://doi.org/10.31797/vetbio.692422>

Research Article

Mehmet ÇELİK¹

Sevil ERDENLİĞ
GÜRBİLEK²

¹ LTS BioPhotonic
Biyoteknoloji Şti.

² Harran Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji ABD,
Eyyübiye Kampüsü,
Şanlıurfa

ORCID-

¹0000-0002-3541-9544

²0000-0002-0377-2650

Correspondence

Sevil ERDENLİĞ
GÜRBİLEK

Doç. Dr. Mikrobiyoloji

serdenlig@harran.edu.tr

Article info

Submission: 21-02-2020

Accepted: 04-06-2020

Online First: 07-08-2020

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a
Creative Commons Attribution 4.0

International License



GİRİŞ

Sığırlarda *Mannheimia haemolytica*'nin neden olduğu solunum sistemi hastalığı (Mannheimiosis, shipping fever, pnömonik pastörelloz) sığırların en önemli solunum yolları hastalıklarından biridir ve dünya genelinde tüm sığır ölümlerinin yaklaşık %30'undan sorumludur (Adamu, 2007). Mannheimiosis yemden faydalanamama, süt verimliliğinde azalma, canlı vücut ağırlığının düşüşüne ayrıca ilaç ve bakım giderlerinin artmasına neden olmaktadır. Oluşan zararın çeşitli stres etkileri ile ve/veya virüs ve bakteriler sebebiyle ile daha da arttığı tespit edilmiştir. Bunlar, süttten kesme, kötü beslenme, nakliye, normalden fazla sayıda hayvan içeren ahırda yaşama ve ani iklim değişiklikleri gibi stres faktörleri önemli rol oynamaktadır. Örneğin Amerika'da sığır endüstrisine verdiği zarar yıllık 3 milyar doları aştığı bildirilmektedir (Singh, 2011).

M. haemolytica *Proteobacteria*'ların *Gammaproteobacteria* sınıfı *Pasteurellales* takımı, *Pasteurellaceae* ailesi, *Mannheimia* cinsi içerisinde yer alır. *Mannheimia* cinsinin önemli bir türü olan *M. haemolytica* Gram negatif, hareketsiz, sporsuz, kapsüllü, kokobasil tarzında, fermentatif, oksidaz pozitif, katalaz pozitif, fakültatif anaerobik bir bakteridir (Adamu, 2007).

M. haemolytica'nın 12 kapsüler serotipinden A1 ve A2'nin tüm dünyada yaygın olduğu ve her ikisinin de sığır ve koyunların üst solunum yollarında kolonize olduğu belirtilmiştir. Hastalığın etyolojisinde A6, A7, A9 ve A12 gibi diğer serotipler bildirilse de, sığır mannheimiozisinin en önemli etkeni A1 olarak kabul edilmektedir. Araştırmalar solunum sistemi hastalığı olan bireylerde serotip 1'in %70,7 oranında bulunduğu bildirilmektedir (Rice vd., 2008). Sağlıklı sığırlar sıklıkla üst solunum kanalında her iki serotipi taşımasına rağmen, takip eden stres veya hasta

hayvanlardan horizontal bulaşma ile A2'nin yerini öncelikli serotip olarak A1 alır. Nasofarengeal bölgenin selektif olarak A1 serotipi ile kolonizasyonu mannheimiosisün başlaması için ön koşuldur. Bu durumun sonucunda, bakteri içeren hava damlacıklarının trachea ve akciğerlere inhalale edilmesi hastalığın başlamasına katkıda bulunur. Tam mekanizma çok açık olarak bilinmemesine rağmen çevresel stress faktörleri ve beraberinde eşlik eden viral ve bakteriyel ajanlar A1 serotipinin üst solunum yollarında hızlıca artmasına neden olur (Rice vd., 2008; Singh, 2011). Davies ve diğerleri (1997), A1 ve A6 serotipinin sığır pnömonik mannheimiozisinin hemen hemen tüm vakalarının sebebi olduğunu belirtmişlerdir.

M. haemolytica, hastalığın patogeneğinde önemli rol üstlenen birçok virülans faktörüne sahiptir (Jeyaseelan vd., 2002). *M. haemolytica*'nın potansiyel virülans faktörleri arasında lökotosin (Lkt), lipopolisakkarit (LPS), dış membran proteinleri (outer membran proteins, OMP), kapsüler polisakkaritler, adhesinler, fimbria, lipoproteinler, nörominidaz, süperoksit dizmutaz (metallo-enzim), sialoglikoproteaz ve transferrin bağlayıcı proteinler sayılabilir (Rice vd., 2008; Zechinon vd., 2005). Bunlardan Lkt pnömoninin gelişmesinde en önemli role sahiptir. Lkt, 102-105 kDa'lık bir *M. haemolytica* ekzotoksinidir ve logaritmik üreme fazında bakterinin tüm serotipleri tarafından salgılanır. *M. haemolytica*'nın önemli bir virülans faktörüdür ve tüm lökositlerin parçalanmasına neden olur. Tüm *M. haemolytica* suşları Lkt üretmesine rağmen, aralarında üretilen Lkt miktarı ve aktivitesi ile ilgili farklar mevcuttur (Rice vd., 2008; Saadati vd., 1997). Sığır ve koyunlardaki *M. haemolytica* suşlarının çoğu Lkt üretmesine rağmen bu suşların hepsi eşit miktarda Lkt üretmezler ve benzer lökotosik aktivite göstermezler. *M. haemolytica*'nın farklı serotiplerinin farklı tipte Lkt sentezlediği saptanmıştır. Ayrıca üretilen Lkt miktarı

değişkendir ve dolayısı ile hastalığın patogenezi Lkt miktarı ile doğrusal orantılıdır (Davies ve Baillie, 2003; Stevens ve Czuprynski, 1996). Retzer vd., (1998), yayınladıkları çalışmada, demir elde etmede (TbpA ve TbpB) işlev gören *M. haemolytica* dış zar proteinlerinin muhtemelen bir yapışma molekülü olarak işlev gördüğünü belirtmiştir. Bunun yanı sıra yapılan çalışmalarda, üç büyük demir bağlayıcı dış membran proteini (IROMPs) identifiye edilerek *M. haemolytica*'nın demir kısıtlı ortamlarda da kolayca ürediği bulunmuştur.

M. haemolytica üremek için besin maddelerine olan gereksinimi açısından nazlı bir bakteri olarak kabul edilmektedir. Sıvı besiyerinde *M. haemolytica*'nın üremesi ortamın asitliğini artırmaktadır (Panciera ve Corsvet, 1984). Öyleki üretilen asetik asit bazen üretilen total bakteri sayısının üzerine çıkmaktadır. Besiyerindeki karbonun büyük kısmı asetik asit birikimine yol açtığı için karbon sınırlı besiyerlerinin bu yüzden biyokütlenin artışına neden olurken asetik asit üretimini sınırladığı ve lökotoksin üretimini artırdığı bildirilmektedir (Oppermann vd., 2017). Besi yeri bileşiminin Lkt üretiminde etkili olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Bakterinin üretimi için en yaygın olarak kullanılan besiyerleri içine sıklıkla sığır fötal serum veya albümin katılan Brain heart infüzyon broth (BHIB) ve RPMI 1640 besiyerleridir. Ancak katılan bu bileşenlerin lkt üzerine bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Saadati vd., 1997; Urban-Chmiel vd., 2004). Du perez vd., (2008), yaptığı bir çalışmada karbonun sınırlandırıldığı vasatların kullanımı lökotoksin konsantrasyonunu maksimize ederken asetik asit üretimini minimize etmiştir. Genel olarak kabul edilen görüşe göre bakterilerin in vitro ortamlarda ürerken eksprese ettikleri antijenler in vivo ürerken gösterdiklerinden bir hayli farklıdır. Örneğin bazı virülans faktörleri standard laboratuvar besiyerinde üreyen bakteriler tarafından salgılanmazken, bunlar konakçı

içinde ürerlerken ya da demirin kısıtlı olduğu invitro besiyerlerinde salgılanabilirler (Smith, 1990).

Odendaal ve Ellis (1999), lkt'nin fazla miktarda üretilmesinde *M. haemolytica*'yı fermentörde %3,5 fötal buzağı serum içeren RPMI 1640 besiyerinde üretmişler ve yüksek düzeyde toksin elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Lkt toksoidini de içeren kültür süpernatantından elde edilen toksoid aşılarda yarattığı güçlü bağışıklık ve serotip spesifikliğinin büyük ölçüde olmayışı ile hastalığa karşı bakterin aşılarda kadar etkili bulunmuştur. Bu aşılarda hastalığın önlenmesinde % 50-70 oranında başarı göstermişlerdir (Shewen ve Wilkie, 1988). Ancak, kültür süpernatant aşımın üretilmesinde karşılaşılan en büyük dezavantaj lkt'nin in vitro ortamda çok düşük konsantrasyonda salgılanması ile oluşan problemdir (Clinkenbeard vd., 1989).

Bu amaçla, bu çalışmada daha önceki çalışmalarda sığırların pnömoni vakalarından izole edilmiş olan 3 farklı *M. haemolytica* suşu referans *M. haemolytica* suşu ile birlikte biri minimal besi yeri ve üçü zenginleştirilmiş olmak üzere toplamda 4 farklı besiyerlerinde üretilmiştir. Test kültürlerinin üremelerinin çeşitli safhalarında alınan örneklerinden canlı bakteri sayımları yapılmış ve en iyi üreme sağlayan besiyeri belirlenmiştir. Ayrıca bu test suşlarının zenginleştirilmiş ve minimal besi yerinde üretilmesi sonucu elde edilen kültür filtratlarının lkt seviyeleri ELISA ile karşılaştırılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bakteriyel suşlar ve kullanılan besiyerleri

Bu çalışmada kullanılan 3 *Mannheimia haemolytica* suşu daha önce sığır hastalık olgularından izole edilmiş ve kontrol suş ise American Type Culture Collection BAA-410 *Mannheimia haemolytica* serotip 1 referans suşudur. Çalışmada kullanılan tüm identifikasyon besi yeri ve solüsyonları ve

suşların üretiminde kullanılan Brain heart infusion broth (BHIB), BHIB+%1 Yeast Extract, BHIB+%5 steril atserumu besiyerleri klasik bakteriyel prosedürlere göre yapıldı (Winn vd., 2006). RPMI 1640 besi yeri ticari olarak temin edildi. Çalışma için alınan 'Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı' 2015/08 nolu kararlar ve 23.03.2015 tarihinde alınmıştır.

Test besiyerlerinde test suşlarının üretimi

Mannheimia haemolytica olarak tanımlanan referans suş MH03 ve test suşları MH04/ MH05/ MH06 olarak adlandırıldı. Kültürlerin MacConkey agarda üreme durumları, kanlı agarda gösterdikleri hemoliz, indol oluşturmaları, oksidaz, üreaz ve katalaz aktiviteleri ve nitratları indirgeyip indirgemedikleri test edildi. Tespit edilen suşlar BHIA (Brain Heart Infusion Agar) ekilerek ve 37°C de 18 saat üremeye bırakılıp, sonrasında agar yüzeyinden fizyolojik tuzlu su ile toplandı. BHIB, BHIB+%1 Yeast Extract, BHIB+%5 Serum ve RPMI besiyerleri seçilen besiyerleri olarak hazırlandı. Erlenmayer içinde 250 ml olarak hazırlanan bu besiyerlerinin her birine FTS içinde toplanan bakteri solüsyonundan, ekilecek hacmin %10'u kadar yani 25 ml eşit olarak ekildi ve ekilen besiyerleri 24 saat süre ile 37 °C de inkübatörde bir çalkalayıcı üzerinde üremeye bırakıldı. Üremenin 6., 12., 15., 18., 24. saatlerinde her bir test besiyerinden steril şartlarda 2 ml numune alındı. Sonuçta 4 besiyeri 4 suş kombinasyonundan dolayı toplam 16 numuneden canlılık sayımı gerçekleştirildi. Denemelerin hepsi iki kez tekrarlandı.

Tests bakterilerinin canlılık sayımı

Bu amaçla klasik yöntemlere göre bakteri canlılık sayımı yapıldı. Bu amaçla içinde 9 ml. PBS bulunan 10 adet steril tüp alındı. Canlılık sayımı yapılacak test kültürlerinden 1 ml alınarak birinci tüpe konuldu. Tüp karıştırıldıktan sonra bundan 1 ml alınarak ikinci tübe aktarıldı ve bu işlem onuncu tüpe kadar aynı şekilde devam etti. BHIA agarların

yüzeyine son dört dilüsyonundan 3'er agar 0.1'er ml. ekildi. Petriler 72 saat süreyle 37°C'de inkubasyona bırakıldı. Bu süre sonunda petrilerdeki koloniler ayrı ayrı sayılarak önce her dilüsyonun kendi arasında, sonra üç dilüsyonun ortak aritmetik ortalamaları alınarak hesap edildi. Bu, 0.1 ml.'deki bakteri sayısıdır. Bunun 10 ile çarpımı 1 ml.'deki bakteri sayısını verdi.

Test besiyerlerin kültür süpernatantlarında lökotosin seviyelerinin karşılaştırılması

Tüm test besiyerlerinde log fazının sonlarına doğru alınan bakteri kültürleri 5000X g. de 4 °C de 10 dakika süre ile santrifüj edildiler. Santrifüj sonrasında süpernatant solüsyonları 0.22 µm filtre şırınga kullanılarak filtre edilmek sureti ile bakterilerden arındırılarak sterilize edildiler. Filtre edilen 16 farklı kültür süpernatant solüsyonu bekletilmeden direkt ELISA da solid faz antijeni olarak kullanıldılar.

Direkt ELISA

Direkt ELISA kullanımında Winn vd., (2006), tarif ettiği yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Filtre edilen kültür süpernatantlarının her biri 0.05M sodyum karbonat (pH 9.6) antijen kaplama tampon solüsyonu içinde sulandırılarak 96 gözlü düz tabanlı polistiren pleytlerin (NUNC 692620) her bir sırasının 11 kuyucuğuna 100 µl olarak taksim edildi. Sıranın 12. kuyucuğu blank olarak bırakıldı. Daha sonra antijenle kaplanan pleytler 4 °C de 18-24 saat inkübe edildi. Daha sonra pleytler % 0.05 Tween 20 içeren PBS (PBS/T) ile 4 kez yıkandı. Pleytler %1 yağsız süt tozunun (Sigma, skim milked) PBS/T içindeki solüsyonu ile 2 saat süre ile bloklandılar. Pleytlerin 4 kez yıkanmasının ardından pleytlerin her bir kuyucuğuna Horse radish peroxidase (HRPO) ile işaretlenmiş *M. haemolytica* anti-lökotosin antikorunun (*Mannheimia haemolytica* leukotoxin antibody-HRPO conjugated (Biorbyt, orb243804)) PBS/T içinde yapılan çalışma dilüsyonunda 100 µl olarak taksim edildi. Pleytler üstü kapalı olarak oda ısısında 1

saat süre ile inkübe edildiler. Pleytler tekrar 5 kez yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa 100 µl kromojenik substrat (0.05 M sitrat tamponu içinde o-Phenylenediamine Dihydrochloride (OPD) 0.4mg/ml, pH 5.5) ilave edildi. Pleytler oda ısısında 10 ila 15 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için stop solüsyonu eklendi pleytler otomatik ELISA okuyucusu (VERSAmax 3.13/B2573) ile 490 nm'de absorbans değerleri okundu. Her bir besiyeri/suş kombinasyonunun okunan absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve lökotosin üretiminin en fazla olduğu besiyeri ve suş kombinasyonları belirlendi.

Etik Beyan

Bu çalışma Dollvet-HADYEK den alınan 2015/08 nolu izin ile gerçekleştirilmiştir

İstatiksel Analiz

Dört farklı besiyerinin 4 ayrı suş için değerlendirilmesinde çoklu karşılaştırmalarda

varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Veriler IBM SPSS Statistics 22.0,2013, release 22.0.0.0 kullanıldı.

BULGULAR

Test besiyerlerinde test suşlarının üreme sonuçları

Üretime alınan bakteriler *Mannheimia haemolytica* BAA-410 referens suşu (MH 03), test suşları ise *Mannheimia haemolytica* 04 (MH 04), *Mannheimia haemolytica* 05 (MH 05), *Mannheimia haemolytica* 06 (MH 06) olarak isimlendirildi. Test ve referens suşların 1,2,3 nolu besiyerlerinde yapılan kültürlerinin belli zaman aralıklarında (6. 12. 15. 18. ve 24. Saatlerinde) yapılan canlılık sayımları Tablo 1 de verildi. Suşların RPMI besiyerindeki canlılık sayımları Tablo 2 de verilmiştir.

Tablo 1. *M. haemolytica* suşlarının farklı besiyerlerinde üreme sonuçları

	6. Saat*	12. Saat	15. Saat	18. Saat	24. Saat
1*)MH 03	110x10 ⁶	135x10 ⁶	144x10 ⁶	155,5x10 ⁶	161x10 ⁶
2*)MH 03	123,5x10 ⁶	141,5x10 ⁶	161,5x10 ⁶	172x10 ⁶	180,5x10 ⁶
3*)MH 03	104,5x10 ⁶	125x10 ⁶	148,5x10 ⁶	155x10 ⁶	196x10 ⁶
1)MH 04	91x10 ⁶	101,5x10 ⁶	113x10 ⁶	125x10 ⁶	142,5x10 ⁶
2)MH 04	98x10 ⁶	149x10 ⁶	163,5x10 ⁶	185x10 ⁶	210x10 ⁶
3)MH 04	188,5x10 ⁶	215x10 ⁶	218x10 ⁶	220,5x10 ⁶	270x10 ⁶
1)MH 05	65x10 ⁶	88,5x10 ⁶	106,5x10 ⁶	135x10 ⁶	176,5x10 ⁶
2)MH 05	120x10 ⁶	134x10 ⁶	153x10 ⁶	167x10 ⁶	218x10 ⁶
3)MH 05	129,5x10 ⁶	142,5x10 ⁶	158,5x10 ⁶	180x10 ⁶	232,5x10 ⁶
1)MH 06	85,5x10 ⁶	117x10 ⁶	148,5x10 ⁶	190x10 ⁶	205x10 ⁶
2)MH 06	141x10 ⁶	178x10 ⁶	194x10 ⁶	225x10 ⁶	290x10 ⁶
3)MH 06	102,5x10 ⁶	136,5x10 ⁶	177,5x10 ⁶	200,5x10 ⁶	275,5x10 ⁶

* Sonuçlar koloni oluşturma birimi(KOB/ml) olarak verilmiştir.

1* BHIB; 2*BHIB+%1 Yeast Extract; 3*BHIB+%5 Serum

Tablo2. *M. haemolytica* suşlarının RPMI besiyerinde üreme sonuçları

	6. Saat*	12. Saat	15. Saat	18. Saat	24. Saat
R*-MH03	32X10 ⁶	43,5X10 ⁶	44,5x10 ⁶	66,5X10 ⁶	82X10 ⁶
R-MH04	20,5X10 ⁶	37,5X10 ⁶	45x10 ⁶	56X10 ⁶	73X10 ⁶
R-MH05	46X10 ⁶	54X10 ⁶	55x10 ⁶	69,5X10 ⁶	83,5X10 ⁶
R-MH06	36X10 ⁶	49,5X10 ⁶	55,5x10 ⁶	66X10 ⁶	78,5X10 ⁶

* Sonuçlar koloni oluşturma birimi(KOB/ml) olarak verilmiştir.

R* RPMI besiyeri için kullanıldı.

Çalışmada bakterinin log fazındaki üreme istenildiğinden artışın olduğu dönemde üreme sonlandırılarak lökotosinin en fazla saptanabileceği bildirilen kültürler elde edilmeğe çalışıldı. Bulgulara göre besiyerlerinin canlı bakteri sayımı üzerine etkileri açısından aralarındaki farklılıklar değerlendirildiğinde RPMI (R) besiyeri, BHIB (1), BHIB+%1 Yeast(2), BHIB+%5(3) besiyerlerinden istatistiki açıdan önemli derecede farklı bulunmuştur (P<0.001). Bir nolu besiyeri olan BHIB, R besiyerinden istatistiki olarak farklı bulunurken 2 ve 3 nolu besiyerleri için istatistiki olarak farklı bulunmamıştır (P>0.05). BHIB+%1 Yeast besiyeri R besiyerinden istatistiki olarak farklı bulunurken 1 ve 3 nolu besiyerleri için istatistiki olarak farklı bulunmamıştır (P>0.05). BHIB+%5 besiyeri R besiyerinden istatistiki olarak farklı bulunurken 1 ve 2 nolu besiyerleri için istatistiki olarak farklı bulunmamıştır (P>0.05). Bu bulgulara göre canlılık sayısını destekleme yönünde 2 ve 3 nolu besiyerleri benzer bulunmuştur. Canlılık sayısını en fazla artıran besiyeri BHIB+%5serum besiyeri oldu. Çalışmada kullanılan suşlar düzeyinde tüm besiyerleri karşılaştırıldığında sonuçlar MH03, MH04, MH05 ve MH06 suşlarının besiyerlerindeki canlılık sayım sonuçları (üreme özellikleri) açısından aralarında istatistiki olarak bir fark görülmedi (P>0.05). Diğer bir değişle canlılık

sayımları üzerine besiyerlerinin etkisi olurken suşların herhangi bir etkisi olmamıştır.

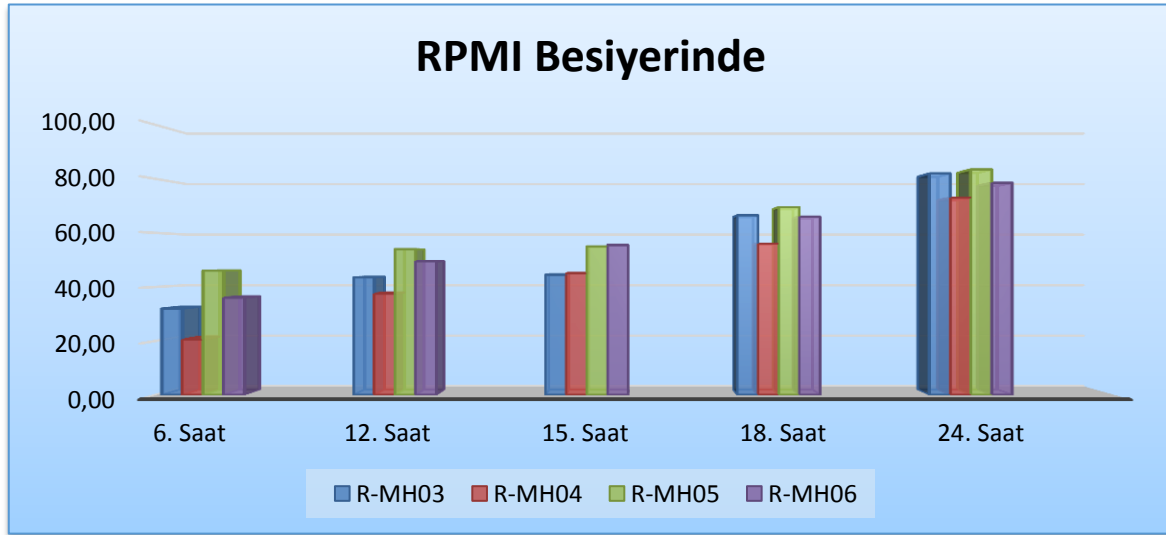
Test besiyerlerin kültür süpernatantlarında lökotosin seviyelerinin karşılaştırılması sonuçları

Dört farklı besiyerinde üreyen 4 farklı suşun kültür filtratları direkt ELISA da lökotosin miktarı açısından karşılaştırıldılar. Karşılaştırmada 16 farklı kombinasyonun kültür filtratlarının antijen olarak kullanıldığı direkt ELISA da elde edilen optik dansite (OD) değerlerinin ortalaması baz alınmıştır. Sonuçlar Tablo 3. de gösterilmiştir. Besiyerlerinin lökotosin oluşturma özellikleri arasında istatistiki açıdan önemli bir fark vardı. Buna göre RPMI besiyeri, BHIB (1), BHIB+%1 Yeast(2), BHIB+%5(3) besiyerlerinden istatistiki açıdan önemli derecede farklı bulunmuştur (P<0.001). RPMI besiyerinde canlılık sayıları en az bulunurken lökotosin en yüksek seviyede bulundu. Tüm test suşları RPMI minimal besiyerinde diğer besiyerlerine göre daha fazla lökotosin salgıladılar. Yapılan deneye göre en yüksek lökotosini MH05 ve ikinci olarak MH06 suşları ürettiler. MH03 ve MH04 arasında bu açıdan önemli bir fark gözlenmedi. Her ne kadar suşlar arasında lkt düzeyi arasında bir fark gözlenirse de bu istatistiki anlamda önemli bir farklılık değildi. Suşlar arasında lkt üretme kabiliyeti yönünden belirgin farklar olabileceği belirtilse de

çalışmamızda kullanılan suşlar arasında belirgin bir fark gözlenmedi.

Tablo 3. Test besiyerlerin kültür süpernatantlarında lökotoksin seviyelerinin direkt ELISA ile karşılaştırılması

Suş/besiyeri kombinasyonu	Optik dansite (OD)değeri ortalaması	Blank OD/- kontrol OD ort.	Suş/besiyeri kombinasyonu	Optik dansite (OD)değeri ortalaması	Blank OD/- kontrol OD ort.
MH 03 BAA-410/BHIB	0.637	0.035/0.09	MH 05/ BHIB	0.792	0.05/0.09
MH 03 BAA-410/ BHIB+%1 Yeast Extract	0.541	0.04/0.09	MH 05/ BHIB+% 1 Yeast Extract	0.676	0.045/0.09
MH 03 BAA-410/ BHIB+%5 serum	0.522	0.04/0.095	MH 05+ %5 serum	0.6	0.055/0.12
MH 03 BAA-410/ RPMI	0.828	0.045/0.09	MH 05/ RPMI	1.286	0.05/0.095
MH 04/ BHIB	0.523	0.04/0.09	MH 06/ BHIB	0.669	0.055/0.1
MH 04/ BHIB+%1 Yeast Extract	0.503	0.035/0.09	MH 06/ BHIB+% 1 Yeast Extract	0.608	0.045/0.09
MH 04+ %5 serum	0.489	0.04/0.1	MH 06+ %5 serum	0.555	0.05/0.1
MH 04/ RPMI	0.771	0.04/0.09	MH 06/ RPMI	0.948	0.055/0.13



Şekil 1. RPMI besiyerinde 4 farklı suşun üreme durumları (1. sütun MH03, 2. sütun MH04, 3. sütun MH05, 4. sütun MH06)

TARTIŞMA

M. haemolytica, hastalığın patogenezinde çok önemli role sahip birtakım virülans faktörlerine sahiptir. *M. haemolytica*'nın potansiyel virülans faktörleri arasında lökotoksin (Lkt), ve Lipopolisakkarit (LPS) en önemli olan virülans faktörlerindedir. Lkt, 102-105 kDa'lık bir *M.*

haemolytica ekzotoksini olup metabolik aktif hücreler lökotoksini logaritmik faz boyunca en fazla üretilirler ve lag fazı boyunca Lkt azalmaya devam eder. Logaritmik üreme fazında bakterinin tüm serotipleri tarafından lökotoksinin salgılandığı belirtilmektedir (Shewen ve Wilkie, 1985). Lökotoksine doğal

ya da deneysel yol ile maruz kalan sığır ve koyunlarda lkt'a karşı gelişen antikörlerin hastalığa karşı bağışıklıkta koruyucu olduğu gösterildikten sonra bu moleküle duyulan ilgi artmış ve *M. haemolytica* A1 kültür süpernatantı, mannheimiosa karşı aşılama için kullanılmaya başlanmıştır. Ancak lkt geninin in vitro ve in vivo ekspresyonu ve lkt'nin üretim düzeyleri suşlar arasında farklılık göstermekte ve ayrıca in vitro üretimi oldukça azdır. Sığır ve koyunlardan izole edilen *M. haemolytica* suşlarının çoğu lkt üretmesine karşın tüm suşlar eşit olarak patojenik değildir. Çünkü bu suşlar benzer lökotosik aktivite göstermezler üretilen lökotosin miktarları değişkendir ve dolayısı ile hastalığın patogenezi salgılanan lkt miktarı ile doğrusal orantılıdır (Rice vd., 2008; Saadati vd., 1997).

Bu nedenlerle çalışmamızda 4 farklı *M. haemolytica* suşunun 4 değişik besiyerlerinde lökotosin üretme yetenekleri karşılaştırıldı. Ayrıca endüstriyel aşı üretimindeki hedef karlılık olduğu için birim besiyerinden alınan bakteri sayısının en fazla olduğu besiyerinin kullanılması amaçlandı. Bakterinin üretimi için en yaygın olarak kullanılan besiyerleri içine sıklıkla sığır fetal serum veya albumin katılan Brain heart infüzyon broth (BHIB) ve RPMI 1640 besiyerleridir (Saadati vd., 1997; Urban-Chmiel vd., 2004). Test ve referans suşların bu besiyerlerinde kültürlerinin 6. 12. 15. 18. ve 24. saatlerindeki canlılık sayımları yapılarak lkt'nin en fazla üretildiği log fazında alınması sağlandı.

M. haemolytica üremek için besin maddelerine olan gereksinimi açısından nazlı bir bakteri olarak kabul edilmektedir. *M. haemolytica* sıvı besiyerinde ürerken fazla miktarda asetik asit biriktirmekte ve bu da ortamın asitliğini etkilemektedir (Panciera ve Corsvet, 1984; Winn ve ark, 2006). Öyleki üretilen asetik asit bazen üretilen biyokütlenin üzerine çıkmaktadır. Besiyerindeki karbonun büyük kısmı asetik asit birikimine yol açtığı için karbon sınırlı besiyerlerinin bu yüzden asetik asit üretimini sınırlandırdığı ve lökotosin

üretimini artırdığı bildirilmektedir (Oppermann vd., 2017).

Bu çalışmada alınan sonuçlara göre besiyerlerinin canlı bakteri sayımı üzerine etkileri açısından aralarındaki farklılıklar değerlendirildiğinde, RPMI besiyeri diğer besiyerlerinden anlamlı derecede farklı bulunmuştur ($P<0.001$). Canlılık sayısını en fazla artıran besiyeri BHIB+%5 serum besiyeri olmasına karşın canlı bakteri sayısının en az olduğu besiyeri RPMI olmuştur. Bu sonucun nedeni içinde bol miktarda karbon kaynağı, vitamin ve amino asit bulunan kimyasal olarak tanımlı olmayan BHIB ve bu besiyerine ekstra vitamin kaynağı olarak eklenen yeast extract ve diğer esansiyel besin öğeleri açısından zengin olan serumun da ilavesi ile test suşları beklendiği gibi en iyi üremeyi RPMI haricindeki besiyerlerinde göstermişlerdir. Zira RPMI besiyerinde bakteriler karbon ve demir sınırlı bir ortamda üremek zorunda kalmışlardır. Bu bulgumuzu birçok araştırmacının bu yöndeki bulguları da desteklemektedir (Du Preez vd., 2008; Odendaal ve Ellis, 1999; Oppermann vd., 2017; Shewen ve Wilkie, 1988).

Test edilen MH03, MH04, MH05 ve MH06 suşlarının besiyerlerindeki canlılık sayım sonuçları (üreme özellikleri) açısından aralarında istatistiki olarak bir fark görülmemiştir ($P>0.05$). Gıda maddelerinin bol olduğu besiyerlerinde canlılık sayısının fazla olması ve tersi durumda az olması beklenen bir durum olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada 4 farklı besiyerinde üreyen 4 farklı suşun kültür filtratları direkt ELISA da lökotosin salgılanması açısından karşılaştırıldılar. Karşılaştırmada 16 farklı kombinasyonun kültür filtratlarının antijen olarak kullanıldığı direkt ELISA da elde edilen optik dansite (OD) değerlerinin ortalaması baz alınmıştır. Tüm suşlar RPMI besiyerinde diğer besiyerlerine göre daha fazla lökotosin oluşturdular. Yapılan deneye göre en yüksek lökotosini MH05 ve ikinci olarak MH06

suşları ürettiler (Tablo 3. ve Şekil1.) MH03 ve MH04 arasında bu açıdan önemli bir fark gözlenmedi. Ancak burada lkt oluşturma kabiliyetleri açısından çok önemli bir fark görülmedi. Oysa tüm. *M. haemolytica* suşlarının farklı düzeylerde lökotoxin salgıladıkları bilinmektedir. Muhtemelen bu çalışmada fazla sayıda *M. haemolytica* izolatu ile yapılsaydı, belki de izolatların farklı lkt oluşturdıkları gözlenebilecekti. Besiyerleri lökotoxin üretimi açısından istatistiki olarak birbirlerinden önemli derecede farklı idi ($p < 0.001$). En fazla lökotoxin üretimi RPMI besiyerinde oldu. Bakterilerin ekprese ettiği virülans faktörlerinin infekte konakçıda ve standard laboratuvar besiyerlerinde birbirinden oldukça farklı olduğu bilinmektedir (Davies ve ark, 1992; Oppermann vd., 2017; Singh, 2011; Smith, 1990). RPMI besiyerinde olduğu gibi bakterinin maruz kaldığı açlık ve demir kısıtlı ortamlar, bakteriye bir canlı içinde çoğalmaya çalışmayı taklit eden bir çevre yaratabilir. Örneğin *M. haemolytica* siderofor üretmediği için demiri elde etmek için çeşitli virülans fatörleri sağlamakta ve bunu demir sağlamada önemli bir mekanizma olarak kullanmaktadır (Singh vd., 2011).

Bu çalışmada canlılık sayımı ile lökotoxin arasında bir korelasyon gözlenmemiştir. Zaten yüksek hücre yoğunluğunun yüksek lökotoxin düzeyini yansıtmadığı birçok araştırmacı tarafından da bildirilmiş bir konudur (Davies ve ark, 1992; Du Preez vd., 2008; Odendaal ve Ellis, 1999; Oppermann vd., 2017). Sonuç olarak, açlık ve kısıtlı demir varlığı gibi stres faktörlerinin *Mannheimia haemolytica*'nın daha fazla demir ve diğer besin öğelerine ulaşmak için daha fazla lökotoxin üretmesine yol açtığı kanısına varıldı. Bu durum muhtemelen diğer virülans faktörleri için de geçerlidir. Zira açlık ve diğer stres faktörlerinin bakterinin in vivo ortamda karşılaştığı güçlükleri taklit eden ve dolayısı ile virülans genlerinin ifade edilmesini sağlayan bir süreç olduğu bildirilmektedir. (Singh vd., 2011).

SONUÇ VE ÖNERİLER

Aşı üretim aşamalarında veya endüstriyel üretim amacıyla yapılan işlemlerde amaca yönelik etkin üretim, sonuç alınması için önem arz etmektedir. Dolayısı ile lökotoxin üretimi amacı ile optimal besiyerinin seçilmesi ve bu besiyerlerinin toksoid aşı üretiminde kullanılması son derece önemlidir. Lökotoxinin başta olmak üzere diğer virülans faktörlerinin bulunduğu kültür süpernatantlarından yapılan aşuların koruyucu bağışıklıkta önemi bulunduğundan, *M. haemolytica* için aşı üretiminde besiyeri seçilirken canlı bakterinin sayısının çok olmasından ise virülans faktörlerin çok olması öncelikli hedef olmalıdır. *M. haemolytica* sıvı besiyerinde ürerken fazla miktarda asetik asit biriktirmekte ve bu da ortamın asitliğini etkilemektedir. Aşırı asitlik lökotoxin miktarını azaltmaktadır. Bunu kontrol altına almak için kontrollü biyoreaktörlerin kullanımı pH değerini lökotoxin için optimal olan 7,3-8.0 aralığında tumağa yardımcı olacaktır. Lökotoxin üretimi normalde in vitro ortamda son derece az olduğundan, besiyerinin RPMI ve türevleri gibi kimyasal olarak tanımlı besiyeri olması ve bu besiyerlerinin ortama verilecek çözülmüş oksijen, hava, ısı, karışım yoğunluğu pH gibi üreme parametreleri yönünden sürekli takip altında olan fermentörlerde yapılması ekonomik bir aşı üretimine katkı sağlayacaktır

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 16107 proje numarası ile Yüksek lisans tezi olarak desteklenmiştir. Destekleri için kuruma teşekkür ederiz.

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedirler.

KAYNAKLAR

- Adamu, J.Y. (2007).** Mannheimia haemolytica: Phylogeny and genetic analysis of its major virulence factors. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 61, 85-96.
- Clinkenbeard, K.D., Mosier, D.A., Confer, A.W. (1989).** Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by Pasteurella haemolytica leukotoxin. *Infection and Immunity*, 57(2), 420-425.
- Davies, R. L., Parton, R., Coote, J. G., Alison Gibbs, H., Freer, J. H. (1992).** Outer-membrane protein and lipopolysaccharide variation in Pasteurella haemolytica serotype A1 under different growth conditions. *Journal of General Microbiology*, 138, 908-922.
- Davies, R.L., Arkinsaw, S., Selander, R.K. (1997).** Evolutionary genetics of Pasteurella haemolytica isolates recovered from cattle and sheep. *Infection and Immunity*, 65, 3585-3593.
- Davies R.L., Baillie, S. (2003).** Cytotoxic activity of Mannheimia haemolytic strains in relation to diversity of the leukotoxin structural gene lktA. *Veterinary Microbiology*, 92, 263-279.
- Du Preez, J.C., Van Rensburg, E., Kilian, S.G. (2008).** Kinetics of growth and leukotoxin production by Mannheimia haemolytica in continuous culture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 611-618.
- Jeyaseelan, S., Sreevatsan, S., Maheswaran, S.K. (2002).** Role of Mannheimia haemolytica leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. *Animal Health Research Reviews*, 3, 69- 82.
- Odendaal, M.W., Ellis, C.E.(1999).** The production and evaluation of Pasteurella haemolytica leukotoxin in the supernatant of submerged cultures in fermenters. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 66, 265-272.
- Oppermann, T., Busse, N., Czermak, P. (2017).** Mannheimia haemolytica growth and leukotoxin production for vaccine manufacturing-A bioprocess review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 28, 95-100.
- Panciera, R.J., Corsvet, R.E. (1984).** Bovine pneumonic pasteurellosis: model for Pasteurella haemolytica and Pasteurella multocida induced pneumonia in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 45(12), 2532-3537.
- Retzer, M.D., Yu R., Zhang, Y. (1998).** Discrimination between apo and iron-loaded forms of transferrin by transferrin binding protein B and its N terminal subfragment. *Microbial Pathogenesis*, 25(4), 175-180.
- Rice, J.A., Carrasco- Medina, L., Hodgins, D.C., Shewen, P.E. (2008).** Mannheimia haemolytica and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews*, 8, 117- 128.
- Saadati, M., Gibbs, H.A., Parton R., Coote, J.G. (1997).** Characterisation of the leukotoxin produced by different strains of Pasteurella haemolytica. *Journal of Medical Microbiology*, 46, 276-284.
- Shewen, P.E., Wilkie, B.N. (1985).** Evidence for the Pasteurella haemolytica cytotoxin as a product of actively growing bacteria. *American Journal of Veterinary Research*, 46(5), 1212-1214.
- Shewen, P.E., Wilkie, B.N. (1988).** Vaccination of calves with leukotoxic culture supernatant from Pasteurella haemolytica. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 52, 30-36.
- Singh, K., Ritchey, J.W., and Confer, A.W. (2011).** Mannheimia haemolytica: bacterial-host Interactions in bovine pneumonia. *Veterinary Pathology*, 48(2), 338-348.
- Smith, H. (1990)** Pathogenicity and the microbe in vivo. *Journal of General Microbiology*, 136. 377-383
- Stevens, P.K., Czuprynski, C.J., (1996).** Pasteurella haemolytica leukotoxin induces bovine leukocytes to undergo morphologic changes consistent with apoptosis in vitro. *Infection and Immunity*, 64, 2687-2694.
- Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Wood, G. (2006).** *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. (6th Edition). Lippincott Williams & Wilkins. Chapter 8, 459-467.
- Urban-Chmiel R., Wernicki, A., Puchalski, A., Mikucki, P. (2004).** Evaluation of Mannheimia haemolytica leukotoxin prepared in nonsupplemented and BSA and FBS supplemented RPMI 1640 medium. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 7, 1-8.
- Zechinon, L., Fett, T., Desmecht, D. (2005).** How Mannheimia haemolytica defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Veterinary Research*, 36, 133-156.