

## MORAXELLA BOVIS'İN ADHERENS ÖZELLİKLERİNİN HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE İNCELENMESİ

Jale ERDEĞER\*

Nejat AYDIN\*\*

Arife ERTÜRK\*\*\*

### Investigation of adherence of *Moraxella bovis* to various cell cultures.

**Summary:** *Moraxella bovis* is the etiologic agent of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK). Adhesion of bacterium via pilus to corneal epithelial cells has an important role in the pathogenesis of IBK. In this study, adherence of *M. bovis* strains to cell monolayers from different origins were investigated.

To determine the adherence properties of *M. bovis* strains to bovine corneal epithelial (BCE), Madin-Darby bovine kidney (MDBK) and Vero cells, *M. bovis* strains isolated from cattle with IBK were tested for hemagglutination (HA) activity and 6 HA positive, 3 HA negative and a reference *M. bovis* strains were used.

All HA positive *M. bovis* strains adhered in high numbers to BCE and MDBK cells whereas 3 HA negative strains in low number. None of *M. bovis* strains adhered to Vero cells. Treatment of hemagglutinating strains with 10% magnesium chloride inhibited the adherence of strains to BCE and MDBK cells.

As conclusion, it is suggested that there is a correlation between HA and adhesion characteristics of *M. bovis* and the adherence is specific for the cells of bovine origin.

**Özet:** *Moraxella bovis*, sığırların infeksiyöz keratokonjunktivitis'inin (IBK) spesifik etkenidir. İnfeksiyonun patogenezisinde etkenin pilusları ile korneal epitel hücrelere adhezyonun önemli rolü vardır. Bu çalışmada *M. bovis* suşlarının değişik orijinli hücrelere adherens özelliği incelendi.

Bovine corneal epithelial (BCE), Madin-Darby bovine kidney (MDBK) ve Vero hücrelerine *M. bovis*'in adherens özelliklerini incelemek amacıyla, IBK'li sığırlardan izole edilen suşların hemagglutinasyon (HA) özellikleri saptanarak, 6 HA pozitif, 3 HA negatif ve ayrıca 1 referans suş denemeler için seçildi.

HA pozitif 7 *M. bovis* suşunun tümünün BCE ve MDBK hücrelerine yüksek sayıda, HA negatif 3 suşun ise az sayıda yapıştığı gözlemlendi. *M. bovis* suşlarının hiçbiri Vero hücrelerine yapışmadı. HA pozitif suşların %10 magnezyum klorür ile muamele edilmesiyle BCE ve MDBK hücrelerine yapışma özellikleri büyük oranda inhibe edildi.

Sonuçta, *M. bovis*'in HA ve adherens özellikleri arasında paralellik bulunduğu ve adherens özelliğinin sığır kökenli hücrelere spesifik olduğu belirlendi.

### Giriş

İnsan ve hayvanlarda bakterilerin sebep olduğu birçok hastalığın patogenezisinde, mukozal yüzeylere yapışma önemli rol oynar. "Bak-

teriyel adherens" olarak adlandırılan bu fenomende bakteri ve konakçı dokuları arasında spesifik bir ilişki vardır ve bazı bakteriler hastalık oluşturmak için özel dokuları tercih ederler

\* Doç. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

\*\* Prof. Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

\*\*\* Uzman Vet. Hek. Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Ankara.

(doku tropizmi). Bazı bakteriyel infeksiyonlar tür spesifitesi de göstermektedir. Mikroorganizmaların yüzeyindeki bu adhesiv yapılar "adhesinler" olarak adlandırılırken, konakçı hücre yüzeyindeki adhesiv yapıların karşılıkları ise "reseptör" olarak tanımlanmaktadır (3). Bakterilerin pilusları ve diğer adhesinleri, insan ve hayvanların organ hücrelerinin ve eritrositlerinin sitoplazmik membranlarına lokalize olmuş reseptörlere yapışmasına neden olur (14). Bunu kolonizasyonla birlikte dokulara penetrasyon izler ve ciddi infeksiyöz hastalıklar şekillenir (3).

İnfeziyöz keratokonjunktivitis (IBK) sığırların önemli bir göz hastalığıdır ve bu hastalığın primer etkeni *M. bovis*'tir (2, 12). *M. bovis*'in sadece piluslu suşları patojeniktir ve sığırlarda IBK (8) ve farelerde konjunktival lezyonlar oluşturmaktadır (5). Sadece piluslu izolatlar korneal hücrelere in vitro bağlanmakta (4) ve bu izolatlar konjunktival mukozaya tutunarak kolonize olabilmektedir. Bu IBK'in patogenezisinde ve infeksiyonun şekillenmesinde önemlidir (11, 16).

Yapılan çalışmalarda *M. bovis*'in bovine corneal epithelial (BCE) ve Madin-Darby bovine kidney (MDBK) hücre kültürlerine adhere olduğu, fakat sığır orijinli olmayan hücrelere yapışmadığı gözlenmiştir. Bir suşun pilusuna karşı hazırlanan antiserum, piluslu suşların adherensini inhibe etmekte ve bunları tanımlamaya yaramaktadır (1).

Otoaglutinasyon ve hemaglutinasyon (HA) özelliğine sahip *M. bovis* suşları patojenik olarak kabul edilmektedir (6, 7). Pilusa sahip *M. bovis* suşları tuzlu suda süspansiyon edildiğinde otoaglutinasyon göstermektedir. Bakterilerin bu özelliği %10 MgCl<sub>2</sub> solüsyonunda giderilmektedir (10). Otoaglutinasyon gösteren *M. bovis* suşları tavuk eritrositlerini aglutine etmekte. MgCl<sub>2</sub> süspansiyonları ile HA özelliği de inhibe olmakta ve dolayısıyla pilus varlığı ortadan kaldırılmaktadır. IBK'nin klinik bulguları deneme hayvanlarına piluslu suşlar verildiğinde şekillenmektedir, ancak MgCl<sub>2</sub> ile muamele edilmiş ve pilusuz suşlar ile infekte edilen hayvanlarda hastalık belirlenmemiştir (6). Bu denemelerle *M. bovis*'in virulensi ve hemaglutinasyon arasında var olan ilişki ortaya konulabilmiştir (6, 7, 10).

Bu araştırmada, *M. bovis*'in adherens yeteneğinin ortaya konulması için in vitro bir yöntem olan çeşitli hücre kültürlerine mikroorganizmanın adherensinin incelenmesi, adherens özelliği ile HA ve otoaglutinasyon arasında bir

ilişkinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlandı.

## Materyal ve Metod

*M. bovis* suşları: Testte IBK'li sığırlardan izole edilen ve HA özellikleri saptanan 6 HA pozitif, 3 HA negatif ve 1 referens *M. bovis* suşu kullanıldı. Referens *M. bovis* suşu (IBH65) ABD'den (National Animal Disease Center, Agricultural Research Service, USDA, Ames, Iowa) sağlandı. Mikroorganizma kültürleri Trypticase Soy Broth'da (TSB) 37°C'de 48 saat üretilerek gliserinli TSB'da -70 °C'de saklandı.

*Standart bakteri süspansiyonu:* *M. bovis* suşları %7-10 koyun kanlı agar'da 37°C'de 24 saat üretildi. Fosfat buffer saline (PBS) ile toplanarak süspansiyon edildi ve 1 kez yıkandı. Bakteri sayısı 10<sup>8</sup> bakteri/ml konsantrasyonuna ayarlandı ve hemaglutinasyon testi ile adhesyon testlerinde bu süspansiyon kullanıldı (1).

*Hücre kültürleri:* *M. bovis*'in hücre kültürleri adhesyonunu saptamak amacıyla sığır orijinli bovine corneal epithelial (15) ve Madin-Darby bovine kidney, ayrıca sığır orijinli olmayan Vero hücre kültürleri kullanıldı. BCE hücrelerini hazırlamada, hücre kültürü yapılacak kornealar 5 aylık sığır fötüsünden elde edildi. Sklero-korneal sınırdan bir bistüri yardımıyla eksizye edilen kornealar PBS içine alındı. Petri kutusunda bistüri ile 2-3 mm<sup>3</sup>'lük boyutlara küçültülen doku parçaları üzerine %0.25 tripsin ilave edilerek 37°C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. Aralıklarla vortekslenen doku parçaları bu süre sonunda santrifüj edilerek, serbest kalan korneal epitel hücreleri pelet olarak elde edildi. Hücreler %10 fetal dana serumu içeren Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium içinde kültüre edildi. Yeterli hücre üretmesi 36-72 saat sonunda elde edildi (15).

*Hemaglutinasyon testi:* Alsever solüsyonu ile 1/10 oranında tavuk kanı alındı ve 3 kez PBS (pH 7.2) ile yıkandı. Yıkamış tavuk eritrositleri PBS ile %1 oranında süspansiyon edildi. Test mikropate'lerde yapıldı. Bu amaçla, plate gözlerine 50 · l bakteri süspansiyonu konuldu ve üzerine eşit miktarlarda %1'lik tavuk eritrositleri ilave edildi. Ayrıca plate'nin birer gözünde kan ve antijen kontrolü de yapıldı. Plate'ler karıştırıcıda çalkalandı ve 37°C'de 30 dk. inkubasyonda tutularak sonuçlar değerlendirildi (1).

*Adhesyon testi:* Bildirilen hücre kültürlerinden chamber slayt'larında monolayer doku hücreleri hazırlandı ve PBS ile 3 kez yıkandı. Herbir bölüme 50 · l miktarında bakteri süspansiyonu inkübe edilerek 45 dk. 37°C'de inkübe

edildi. Hücrelere yapışmayan bakterilerin uzaklaştırılması için PBS ile 3 kez yıkandı. Fikze edilerek Giemsa ile boyandı. Doku hücrelerine (en az 10 doku hücresi) yapışan bakteriler sayılarak, her bir hücreye yapışabilecek bakteri sayısı hesaplandı ve deneme iki kez tekrarlanarak ortalama değerleri alındı (1).

MgCl<sub>2</sub>'ün bakteriler üzerindeki etkisini saptamak amacıyla M. bovis suşlarının distile sudaki standart süspansiyonları %10 oranında MgCl<sub>2</sub> ile 37°C'de 30 dk. muamele edildi. Süspansiyon 6000 devirde 30 dk. santrifüj edilerek

Tablo 1. M. bovis'in hücre kültürlerine adherensi.  
Table 1. Adherence of M. bovis to cell cultures

Suş No	Hücrelere adherens sayısı (ortalama)			
	HA	BCE	MDBK	Vero
IBH 65	+	72	65	0
IBK 1	+	57	48	0
IBM 4	+	60	55	0
IBM 16	+	62	57	0
IBM 21	+	65	64	0
IBM 25	+	58	56	0
IBM 26	+	67	43	0
Ortalama		63.0	55.4	0
IBK 2	-	29	20	0
IBK 37	-	27	16	0
IBK 42	-	23	18	0
Ortalama		26.3	18.0	0

Tablo 2. M. bovis'in hücre kültürlerine adherensinde %10 MgCl<sub>2</sub>'ün etkisi.

Table 2. Effects of 10% MgCl<sub>2</sub> on adherence of M. bovis to cell-cultures.

Suş No	MgCl <sub>2</sub> etkisi ile hücrelere ortalama adherens sayısı		
	BCE	MDBK	Vero
IBH 65	8	7	0
IBK 1	5	3	0
IBK 4	7	3	0
IBK 16	6	4	0
IBK 21	6	5	0
IBK 25	4	5	0
IBK 26	4	3	0
Ortalama	5.7	4.4	0
IBK 2	25	18	0
IBK 37	23	11	0
IBK 42	18	15	0
Ortalama	22.0	14.6	0



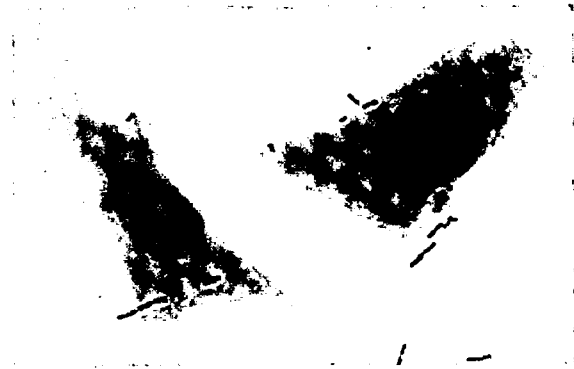
Şekil 1. HA pozitif M. bovis suşunun BCE hücrelerine adherensi (x100).

Figure 1. Adherence of hemagglutinating M. bovis strain to BCE cells (x100).



Şekil 2. HA negatif M. bovis suşunun BCE hücrelerine adherensi (x100).

Figure 2. Adherence of non-hemagglutinating M. bovis strain to BCE cells (x100).



Şekil 3. MgCl<sub>2</sub> ile muamele edilmiş HA pozitif M. bovis suşunun BCE hücrelerine adherensi (x100).

Figure 3. Adherence of MgCl<sub>2</sub> treated hemagglutinating M. bovis strain to BCE cells (x100).

MgCl<sub>2</sub> uzaklaştırıldı. Çöken bakteriler PBS'de tekrar süspansiyon edildi ve hücre kültürlerinde adherensiyon denemeleri yapıldı.

## Bulgular

IBK'li sığırlardan izole edilen 6 HA pozitif, 3 HA negatif ve referens suşun hücre kültürlerine adherensi tablo 1'de gösterilmiştir. Test edilen standart IBH65 suşu ve HA pozitif 6 suşun tümü BCE ve MDBK hücrelerine yüksek sayıda (Şekil 1), HA negatif 3 suş düşük sayıda (Şekil 2) yapıştı. 10 M. bovis suşunun hiçbiri Vero hücrelerine yapışmadı.

M. bovis'in hücre kültürlerine adherensinde  $MgCl_2$ 'ün etkisi tablo 2'de gösterilmiştir. %10  $MgCl_2$  ile muamele edilen M. bovis suşlarının BCE ve MDBK hücrelerine yapışma özelliklerini yüksek oranda kaybettikleri gözlemlendi (Şekil 3).

## Tartışma

İnfeksiyöz keratokonjunktivitis sığırların önemli bir göz hastalığıdır ve bu hastalığın primer etkeni M. bovis'tir (2, 12). Otoaglutinasyon ve hemaglutinasyon özelliğine sahip (piluslu) M. bovis suşları buzağılarda infeksiyon oluşturmuş ve patojenik olarak kabul edilmiştir (8). Piluslu suşların, sığır kornea epitel hücrelerine adherensi, infeksiyöz keratokonjunktivitis'in patogenezisinde önemli bir rol oynar. Sadece piluslu izolatlar sığır kornea hücrelerine in vitro bağlanmakta ve konjunktival mukozaya tutunarak kolonize olabilmektedir (4). Annuar ve Wilcox (1) yaptıkları çalışmada M. bovis'in sığır orijinli hücre kültürlerinden BCE ve MDBK'ya adherans özelliği gösterdiği, ancak sığır orijinli olmayan Vero, CRFR, L, PSEK, BHK hücre kültürlerine ise adherans göstermediğini saptamışlardır. Bunun sığır orijinli hücrelerde varolan ancak, diğer hayvan türlerine ait hücrelerde bulunmayan spesifik reseptör bölgelerinin varlığına bağlı olduğunu sanılmaktadır. Ayrıca, hemaglutinasyon özellikleri saptanmış piluslu suşların pilusuz suşlara göre daha yüksek oranda adherans gösterdiğini bildirmişlerdir.

Çalışmada hemaglutinasyon özelliğine sahip M. bovis suşlarının BCE hücrelerine adherans sayısı ortalama olarak 63, MDBK hücrelerine ise 55.4 olarak bulunmuştur. Vero hücrelerine ise adherans görülmemiştir. Hemaglutinasyon negatif M. bovis suşlarının BCE hücrelerine adhesyon sayısı ortalama olarak 26.3, MDBK hücrelerine ise 18 olarak saptanmıştır. Yine HA negatif suşlarda Vero hücrelerine adhesyon gözlenmemiştir. Bu bulgulara göre HA pozitif suşlarla adhesyon, negatif suşlara göre daha yüksek oranda bulunmuştur. Ayrıca, sığır orijinli olmayan Vero hücre kültürlerinde adherans saptanmamıştır. HA negatif suşların BCE ve MDBK hücre kültürlerine ya-

pışması diğer yüzey adhesinlerine bağlı olarak şekillenmiş olabilir.

Yapılan çalışmalarda pilusun varlığı ile M. bovis'in virulensi arasındaki ilişki gösterilmiştir (9, 13). Gil-Turnes (6) yaptığı çalışmada sadece otoaglutinasyon ve hemaglutinasyon özelliği gösteren M. bovis suşlarının buzağılarda patojenik olduğunu, bu patojenik izolatların  $MgCl_2$  ile muamele edildiğinde onların patojenik etkilerinin ortadan kalktığını göstermiştir. Annuar ve Wilcox (1), M. bovis'in piluslu suşlarının  $MgCl_2$  ile muamele edildiğinde, piluslu suşların hücrelere adheransını büyük ölçüde inhibe ettiğini, pilusuz suşlarda bu inhibisyonun zayıf olduğunu, bunun diğer adhesinlerden ileri gelebileceğini bildirmiştir. Ayrıca Pugh ve Hughes (10), %10  $MgCl_2$ 'ün M. bovis'in otoaglutinasyonunu inhibe ettiğini saptamışlardır.

Bu çalışmada incelenen M. bovis suşları %10  $MgCl_2$  ile muamele edildiğinde, HA özelliği gösteren suşların sığır orijinli hücre kültürlerine (BCE, MDBK) adheransları büyük ölçüde düşmüştür. BCE hücrelerine ortalama 5.7, MDBK hücrelerine ortalama 4.4 bakteri yapışmıştır. HA negatif suşlarda ise  $MgCl_2$  ile muamelelenin fazla etkisi olmamıştır. BCE'de bu sayı 22.0, MDBK'de 14.6 olarak bulunmuştur. HA negatif suşlardaki bu düşük oranda azalma, bazı araştırmacıların da (1) bildirdiği gibi, diğer adhesinlere bağlı şekillenmiş olabilir.

Sonuçta HA ve adherans özellikleri arasında paralellik bulunduğu ve adherans özelliğinin sığır kökenli hücrelere spesifik olduğu belirlenmiştir. Ayrıca buna bağlı olarak M. bovis'in patojenitesi ile hemaglutinasyon arasındaki var olan ilişki ortaya konulabilmiştir. Çeşitli suşların antijenik ilişkilerinin ortaya konulmasında ve aşı suşlarının seçiminde bu karakterler önemlidir.

## Kaynaklar

1. Annuar, B.O. & Wilcox, G.E. (1985). Adherence of *Moraxella bovis* to Cell Cultures of Bovine Origin. Res Vet Sci, 39, 241-246.
2. Baptista, P.J.H.P. (1979). Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. A. Review. Br Vet J, 135, 225-242.
3. Beachey, E.H. (1981). Bacteria Adherence: Adhesin-receptor Interactions Mediating the Attachment of Bacterial to Mucosal Surfaces. J Infect Dis, 143, 325-345.
4. Chandler, R.L., Bird, R.G., Smith, M.D., Anger, H.S. & Turfrey, B.A. (1983). Scanning Electron Microscope Studies on Preparations of Bovine Cornea Exposed to *Moraxella bovis*. J Comp Pathol, 93, 1-8.
5. Chandler, R.L., Turfrey, B.A. & Smith, K. (1989). Development of a Laboratory Model for Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. Res Vet Sci, 32, 128-130.

6. **Gil-Turnes, C.** (1983). *Hemagglutination, Autoagglutination and Pathogenicity of Moraxella bovis Strains*. Can J Comp Med, 47, 503-504.
7. **Gil-Turnes, C. & Ribeiro, G.A.** (1985). *Moraxella bovis Hemagglutinins: Effect of Carbohydrates, Heating and Erythrocytes*. Can J Comp Med, 49, 112-114.
8. **Jayappa, H.G. & Lehr, C.** (1986). *Pathogenicity and Immunogenicity of Piliated and Nonpiliated Phases of Moraxella bovis in Calves*. Amer J Vet Res, 47, 2217-2221.
9. **Pedersen, K.B., Frohalm, L.O. & Bovre, K.** (1972). *Fimbriation and Colony Type of Moraxella bovis in Relation to Conjunctival Colonization and Development of Keratoconjunctivitis in Cattle*. Acta Pathol Microbiol Scand [B], 80, 911-918.
10. **Pugh, G.W. & Hughes, D.E.** (1970). *Inhibition of Autoagglutination of Moraxella bovis by 10% Magnesium Chloride*. Appl Microbiol, 19, 201-203.
11. **Pugg, G.W. & Hughes, D.E.** (1971). *Infectious Bovine Keratoconjunctivitis Induced by Different Experimental Methods*. Corncl Vet, 61, 23-45.
12. **Punch, P.I. & Slatter, D.H.** (1984). *A Review of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis*. Vet Bull, 54, 193-207.
13. **Sandhu, T.S., White, F.H. & Simpson, C.F.** (1984). *Association of Pili with Rough Colony Type of Moraxella bovis*. Amer J Vet Res, 35, 437-439.
14. **Verschlueren, H., Dekegel, D., Gilquin, C., De Maeyer, S. & Lafontaine, A.** (1981). *Pili of Nisseria meningitidis: An Electron Microscopic Study on Their Occurrence, Related to Different Strain Characteristics*. Ann Microbiol (Inst Pasteur), 132 B, 307-319.
15. **Wilcox, G.E.** (1969). *Preparation of Primary Bovine Corneal Epithelial Cell Cultures for Use in Virological Investigations*. Appl Microbiol, 18, 268-269.
16. **Wilcox, G.E.** (1970). *The Aetiology of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis in Queensland. I. Moraxella bovis*. Aust Vet J, 46, 409-414.