✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۵۶ و ۵۷ پاییز و زمستان ۱۳۸۱

سروتایپینگ و تعیین فراوانی ایزوله‌های *E. coli* واجد فیمبریه P در کلی باسیلوز طیور کرمان

● رضا قنبرپور، عضو هیأت علمی گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان
● سید علی پوربخش، عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی، حصارک
● نرجس حامد شماعی، دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۸۰ تاریخ پذیرش: آذر ماه ۱۳۸۱

چکیده

در این بررسی جهت تعیین فراوانی ایزوله‌های واجد فیمبریه *E. coli*، ۳۷۰ ایزوله از موارد کلی باسیلوز طیور گوشتی جداگردید. جهت نمود فیمبریه P هر یک از باکتریها بر روی محیط جامد شش بار پاساژ داده شد و با انجام آزمایش هماگلوتیناسیون باگلبولهای قرمز انسان در حضور و غیاب قند D- مانوز، ایزوله‌های مقاوم و حساس به مانوز تعیین شدند. سپس جهت شناسائی پادگن فیمبریه‌ای، تمام باکتریها به‌روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم نیز مورد آزمایش قرارگرفتند. در مجموع ۱۸ ایزوله در آزمایش هماگلوتیناسیون مقاوم به مانوز بودند که همه آنها در آزمایش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم با پادگن ضد فیمبریه P(F11) طیور واکنش مثبت نشان دادند. لذا فراوانی ایزوله‌های واجد این فیمبریه ۴/۹ درصد برآورد گردید. در سروتایپینگ مشخص شد که تمامی ۱۸ باکتری MRHA که با پادتن ضد فیمبریه P(F11) واکنش نشان دادند جزو گروه سرمی 01 بودند.

کلمات کلیدی: کلی باسیلوز، فیمبریه F11، فیمبریه P، *E. coli*، طیور

✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 56-57 PP: 61-63

Serotyping and frequency of P fimbriated *Escherichia coli* isolated from avian colibacillosis of Kerman

By: Reza Ghanbarpour, Faculty of Veterinary Med. Shahid Bahonar University of Kerman. Seyed Ali Pourbakhah, Razi Vaccine and Serum Research Institute and Narjes Hamed Shamaei. Graduated of the Veterinary Medicine Faculty, Shahid Kerman.

In the present study, 370 isolates of *E. coli* were obtained from colisepticemia cases of broilers. For expression of P fimbriae, isolates were subjected to six consecutive passage on solid media. Isolates were tested for hemagglutination with human erythrocytes in presence and absence of D - mannose for detecting of MRHA and MSAH isolates. All of the isolates tested with indirect immunofluorescence technique for detection of fimbrial antigens. The 18 of 370 isolates showed MRHA with human erythrocytes, that on indirect immunofluorescence all of them reacted with avian P (F11) fimbrial antiserum. the frequency of P fimbriated *E. coli* was 4.9%. Serotype identification revealed that MRHA isolates which expressed P (F11) fimbriae belong to 01 serogroup.

KeyWords: Colibacillosis, P fimbriae, F11 fimbriae, *Escherichia coli*, Poultry.

مقدمه

ایزوله‌های بیماری *E. coli* در طیور و بوقلمون غالباً با سپتی سمی همراه بوده و باعث تلفات زیادی می‌شوند. به همین دلیل امروزه جهت شناسائی و تعیین هویت عوامل حدت *E. coli* مطالعات زیادی صورت می‌گیرد. در این میان فیمبریه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، فیمبریه یا پیلی زواند پروتئینی و رشته‌ای شکلی در سطح باکتری می‌باشد که با ایفای نقش واسطه‌ای، کلنیزه شدن باکتری در سطوح اپیتلیال را تسهیل می‌کند (۴، ۹، ۱۰).

فیمبریه‌های نمود یافته بر روی ایزوله‌های طیوری *E. coli* بر اساس توان اتصال آنها به گلبولهای قرمز گونه‌های مختلف، به دو دسته فیمبریه حساس به مانوز [1] (MSHA) یا تیپ I و مقاوم به مانوز [2] (MRHA) یا P تقسیم می‌شوند. فیمبریه P فقط بر روی ایزوله‌های پاتوژن شناسایی شده است و اهمیت بیشتری در بیماری‌زایی دارد (۳، ۵، ۱۳).

فیمبریه P طیور قادر است به سلولهای واجد ترکیب Gal-α(1-4)Gal متصل شود و مطالعات انجام شده بر روی این فیمبریه نشان می‌دهد که مشابهت زیادی (از نظر سرولوژی، ساختاری و عملکردی) با فیمبریه F11 موجود بر روی ایزوله‌های بیماری‌زای انسان جدا شده از موارد عفونتهای ادراری [3] (UTI) دارد. اولین یافته‌ها در مورد این فیمبریه در ایزوله‌های انسانی نشان داد که ارتباطی بین هماگلوتیناسیون مقاوم به مانوز و فیمبریه F11 وجود داشته و اغلب سویه‌های *E. coli* جدا شده از عفونت‌های ادراری انسان واجد این فیمبریه است. لازم به ذکر است که فیمبریه P (Fn) مشابه طیور، از بوقلمون، سگ و خوکها نیز وجود دارد (۲، ۶، ۸، ۱۱، ۱۵).

در شناسائی و تخلیص فیمبریه P طیور باید توجه داشت که نمود این فیمبریه تحت کنترل شرایط محیطی بوده و در ایزوله‌هایی که از نظر ژنتیکی مثبت هستند نمود آن در محیطهای جامد، فقیر و در دمای ۳۷ درجه

سانتیگراد افزایش می‌یابد (۵).

در سالیان اخیر استفاده از واکسن‌های ضد فیمبریه‌ای در نوزاد برخی حیوانات با نتایج مثبت همراه بوده و در انسان نیز استفاده از واکسن‌های مشابه، در جلوگیری از عفونت‌های ادراری مورد توجه فراوانی قرار گرفته است (۱، ۱۲، ۱۶). با توجه به اینکه مطالعات تجربی اولیه در مورد واکسن‌های چندگانه فیمبریه‌ای در طیور با موفقیت‌هائی همراه بوده است (۷) لذا تعیین فراوانی و سروتیپ‌های شایع و همچنین تعیین نوع سرولوژیکی فیمبریه موجود در سطح ایزوله‌های مناطق مختلف زمینه را جهت تلخیص و تهیه واکسن چندگانه مؤثر بر علیه کلی باسیلوز طیور فراهم می‌کند.

مواد و روش کار

جداسازی *E. coli*

برای این منظور از لاشه‌های طیور ارجاعی به درمانگاه دانشکده دامپزشکی کرمان، با ثبت مشخصات، نمونه‌های باکتری‌شناسی از خون قلب لاشه‌ها برداشت شده و با کشت آنها در محیط‌های مختلف نسبت به جداسازی *E. coli* و تائید آنها با استفاده از خصوصیات بیوشیمیائی (IMVC) اقدام گردید. بدین ترتیب ۳۷۰ باکتری جداسازی و مورد آزمایش قرار گرفت.

شرایط نمود فیمبریه P

با توجه به اینکه این فیمبریه در محیط کشت جامد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نمود می‌یابد لذا هر یک از ایزوله‌ها، متحمل پاساژ متوالی (۲۴ ساعته) بر روی محیط کشت جامد Tryptic Soy (Biolife, Italy) Agar (TSA) در دمای مذکور شدند و بعد از پاساژ ششم باکتریهای کشت شده با استفاده از PBS استریل از سطح محیط جمع‌آوری شدند و آزمایشات بعدی بر روی این سوسپانسیون انجام گرفت (۵).

آزمایش هماگلوتیناسیون

با توجه به توالی اتصالی فیمبریه P، برای این آزمایش از سوسپانسیون ۲٪ گلبولهای قرمز شسته مربوط به گروههای خونی O و A انسانی استفاده شد. برای این منظور ابتدا مقادیر برابری از سوسپانسیونهای باکتریائی و گلبولهای قرمز را مخلوط نموده و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه نتیجه قرائت شد سپس ایزوله‌هائی که هماگلوتیناسیون را نشان دادند، جهت تعیین الگوی هماگلوتیناسیون آنها (حساس یا مقاوم بودن نسبت به مانوز)، آزمایش هماگلوتیناسیون در حضور محلول ۵٪ قند D- مانوز (BBL) تکرار شد (۱۳).

آزمایش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IDFAT)

برای این منظور ابتدا قطره‌ای از سوسپانسیون باکتریائی بر روی لام قرار داده شد و بعد از انجام فیکساسیون، یک قطره از پادتن خرگوشی ضد فیمبریه P طیور (تهیه شده در موسسه رازی بر علیه سویه استاندارد (C1976, O1, K1, F11) با رقت ۱/۵۰ بر روی گسترش قرار داده شد و بعد از گذشت مدت زمان ۳۰ دقیقه (در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد)، گسترش با PBS شستشو داده شد و در مرحله بعدی پادتن کونژوگه فلورسین (FITC) ضد خرگوشی تهیه شده در بز، (Goat Anti - Rabbit, KPL) با رقت ۱/۱۰۰ اضافه گردید و نهایتاً بعد از گذشت مدت زمان لازم گسترش شستشو داده شده و با میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد (۵).

سروتایپینگ سویه‌های واجد فیمبریه P:

باکتری‌هائی که در دو روش فوق واجد فیمبریه ارزیابی گردیدند با استفاده از آنتی سرم‌های استاندارد (Mast diagnostics) و طبق روش پیشنهادی شرکت مذکور تعیین سروتیپ شدند. آنتی سرمهای به‌کار رفته شامل ۴۳ گروه سرمی است که به‌صورت پلی والان و منووالان می‌باشد. لازم به ذکر است از روش آگلوتیناسیون روی لام جهت تعیین گروه سرمی استفاده شد بدین ترتیب که ابتدا سوسپانسیون باکتریائی با آنتی سرمهای پلی والان مختلف مجاور شده و در مواردی که آگلوتیناسیون بروز نمود، سوسپانسیون باکتریائی با هر یک از آنتی سرمهای منووالان دسته (پلی والان) موردنظر مجاور شد.

نتایج

از ۳۷۰ باکتری مورد آزمایش، ۱۸ باکتری هماگلوتیناسیون مقاوم به مانوز را نشان دادند و در آزمایش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم نیز ۱۸ باکتری واجد فیمبریه شناخته شدند. لذا فراوانی این فیمبریه ۴/۹٪ برآورد گردید. تصویر شماره ۱ تظاهر میکروسکوپی یکی از موارد مثبت در آزمایش ایمونوفلورسانس را نشان می‌دهد. همانگونه که در تصویر مشخص است قسمت پیرامونی باکتری به‌صورت درخشان در آمده و پیکره باکتری چنین حالتی نداشته و تیره است که نشانگر اتصال پادتن ضد فیمبریه P به قسمت اطرافی (فیمبریه) و متعاقباً اتصال پادتن کونژوگه است.

همانطور که در بخش قبلی اشاره شد پادتن ضد فیمبریه P طیور تهیه شده در موسسه رازی بر علیه فیمبریه نوع سرولوژیک F11 است که تمامی ۱۸ ایزوله MRHA+ با این پادتن واکنش نشان دادند که حاکی از مشابهت فیمبریه مقاوم به مانوز طیور (P) با فیمبریه F11 سویه استاندارد می‌باشد. در سروتایپینگ ایزوله‌های واجد فیمبریه مشخص گردید که تمامی آنها متعلق به گروه سرمی 01 می‌باشند.

بحث

مطالعاتی که در زمینه کلی باسیلوز طیور در طی سالیان گذشته انجام شده است حاکی از حضور هماگلوتیناسیون در سویه‌های *E. coli* جدا شده به‌ویژه در سرو تیپهای 078, 02, 01 بوده است (۳). یافته‌های بعدی نشان داد که هماگلوتیناسیون بواسطه وجود پیلی یا فیمبریه در این باکتریها بوده و از طرف دیگر ویژگیهای اتصالی در سویه‌های مختلف متفاوت است که نشانگر وجود تنوع در فیمبریه‌ها است (۵). با توجه به حضور فیمبریه در سویه‌های پاتوژن، در سالیان اخیر مطالعات زیادی در مورد نقش فیمبریه‌ها در حدت و بیماری‌زایی *E. coli* انجام شده است (۱۴). در مطالعات تجربی که در سال ۱۹۹۷ پوربخش و همکاران انجام دادند مشخص گردید که سویه‌های کلی باسیل طیوری واجد فیمبریه، در مقایسه با سویه‌های بدون فیمبریه از حدت بیشتری برخوردار است که این نقش از طریق عمل واسطه‌ای فیمبریه‌های P و F1 در اتصال و کلنیزه شدن باکتری در مخاطات تنفسی صورت می‌گیرد (۹، ۱۰).

در سال ۱۹۹۳، Vanden Bosch اولین مطالعه در مورد شناسائی ساختار، عملکرد، ویژگیهای سرولوژی و وزن مولکولی فیمبریه P طیور انجام داد وی با استفاده از روش ELISA میزان حضور این فیمبریه را در سروتیپ‌های شایع کلی باسیلوز طیور ۹۶٪ برآورد نموده و همچنین با استفاده از روش وسترن بلاتینگ نشان دادند که فیمبریه P طیور مشابه نوع سرولوژیکی F11 می‌باشد که از موارد عفونتهای ادراری انسان جدا شده است. در مطالعه مذکور با اینکه تمامی سویه‌های واجد فیمبریه P متعلق به گروه سرمی 01 بودند اما احتمال حضور آن در سایر سروتیپ‌ها رد نشده است (۱۳). در سال ۱۹۹۴ پوربخش حضور فیمبریه مشابهی را در سویه‌های *E. coli* جدا شده از موارد کلی باسیلوز بوقلمون گزارش نمود. لازم به‌ذکر است که سویه مذکور متعلق به سروتیپ 01 بوده و فیمبریه آن با پادتن ضد F11 واکنش مثبت نشان داده و از نظر سایر خصوصیات نیز مشابه F11 بوده است (۱۱).

در سال ۱۹۹۵، Dozois و همکاران در کانادا، شرایط نمود فیمبریه P طیور را مشخص کرده و بعد از کشت سویه‌های *E. coli* طیور در محیط‌های جامد و فقیر، نسبت به ارزیابی حضور این فیمبریه با استفاده از روشهای هماگلوتیناسیون، ایمونوفلورسانس، ایمونودات و ایمونوبلاتینگ اقدام نمود. در این مطالعه تقریباً فراوانی این فیمبریه ۵۰ - ۳۵٪ برآورد شده است که همگی متعلق به گروه سرمی 01 بوده اما محقق یاد شده نیز احتمال حضور آنرا در سایر سروتیپ‌ها محتمل دانسته است (۵).

نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر از نظر تعیین گروه سرمی ایزوله‌های واجد فیمبریه P، با نتایج به دست آمده در تحقیقات Dozois, Vanden Bosch و پوربخش همخوانی دارد و در مطالعات محققین یاد شده نیز فیمبریه مذکور فقط در ایزوله‌های مربوط به گروه سرمی 01 شناسائی شده است. از طرف دیگر یافته‌های محققین یاد شده نیز نشان می‌دهد که فراوانی این فیمبریه در گروه سرمی 01، ۱۰۰٪ می‌باشد که از این نظر نیز نتایج مطالعه حاضر با گزارشات آنها مطابقت دارد. در عین حال ذکر این نکته ضروری است که نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر از نظر تعیین فراوانی حضور این فیمبریه در سروتیپهای جدا شده از طیور تفاوت قابل توجهی با یافته‌های Vanden Bosch دارد که شاید بخاطر تفاوت در تکنیک‌های به‌کار رفته باشد زیرا همانگونه که ذکر شد در مطالعه مذکور از روش ELISA جهت شناسائی ایزوله‌های واجد فیمبریه P استفاده شده است. نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر با یافته‌های Dozois از نظر فراوانی فیمبریه P در گروه سرمی 01 مشابهت دارد اما از نظر تعیین فراوانی ایزوله‌های طیوری واجد فیمبریه مذکور تفاوت دارد. در مطالعه مذکور که در حد ژنتیکی انجام شده است میزان

حضور ژنهای (دسته ژنی) رمز کننده فیمبریه P در ۳۰ - ۳۵٪ از ایزوله‌های *E. coli* جدا شده از طیور شناسائی شده است. نکته قابل توجه اینکه ژنهای مذکور همواره نمود پیدا نمی‌کنند و همچنانکه قبلاً ذکر شد میزان نمود آنها بسته به عوامل محیطی متغیر است. به‌هر حال آنچه مسلم است نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های Dozois همخوانی بیشتری را نسبت به نتایج مطالعه Vanden Bosch نشان می‌دهد.

تفاوتهای موجود در نتیجه ارائه شده توسط محققین مختلف، نیاز به مطالعه کامل‌تر با استفاده از سایر تکنیک‌های پیشرفته به‌ویژه در سطح ژنتیکی و مولکولی را یادآور می‌شود.

پاورقی‌ها

1- Mannose sensitive hemagglutination
2- Mannose resitant hemagglutination
3- Urinary tract infection

منابع مورد استفاده

1- Bertschinger H.U. Nief V. and Tschape H. 2000. Active oral immunization of suckling piglets to prevent colonization after weaning by enterotoxigenic *Escherichia coli* with fimbriae F 18. Vet Microbiol, 71, 255-267.

2- Dodson. K.W. Pinkner J.S. Roset. Magnusson G. Hultgren S.J. and Waksman G. 2001. Structural basis of the interaction of the pyelonephritic *E. coli* adhesin to its human kidney receptor. Cell. 105, 733-743.

3- Doho-Mulin M., Van den Bosch. J.F, Girardeau J.P. Barata. T. and Lation. J.P. 1990. Surface antigens from *Escherichia coli* 02 and 078 strains of avian origin. Infect Immun. 58, 3, 740-745.

4- Doho-Mulin M. and Fairbrother JM., 1999. Avian pathogenic Escherichia coli (APEC). Vet Res. 30, 299-316.

5- Dozois C.M; Pourbakhsh S.A. and Fairbrother J.M. 1995. Expression of p and F1 fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. Vet Microbiol. 45, 297-309.

6- Feria C., Machado, J; Correia, J.D, Goncalves, J and Gaustra. W. 2001. Virulence genes and P fimbriae PapA subunit diversity in canine and feline uropathogenic *Escherichia coli*. Vet Microbiol. 82, 81-89.

7- Gyimah JE., and Parigrahy. 1986. Immunogenicity of an *Escherichia coli* multivalent pilus vaccin in chickens. Avian Dis. 30, 687-689.

8- Otto G., Norbeek, J; Larsson, T; Karlsson. K.A. and Hermansson M. 2001. PAP genotype and P fibrial expression in *Escherichia coli* causing bacteremic and nonbacteremic febrile urinary tract infection. Clin Infect Dis. 32, 1523-1531.

9- Pourbakhsh S.A., Boulianne, M; Martineau - Doize Band Fairbro ther J.M. 1997. Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. Vet Microbiol. 58, 195-213.

10- Pourbakhsh S.A., Dho - Moulin M; Bree A; Desautels C; Martineau - Doize B. and Fairbro ther J.M. 1997. Localization of the in vivo expression of F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. Microbial Pathogenesis. 22, 331-341.

11- Pourbakhsh SA., Fairbrother JM., 1994. Purification and Characterization of P fimbriae from an *Escherichia coli* strain isolated from a septicemic turkey, FEMS Microbiol Letter. 122, 313-318.

12- Staniszewska M., Witkowska. D. and Gamian, A. 2000. Fimbriae as a pathologic factor of bacteria and a carrier in conjugate vaccines. Postepy Hig Med Dosw. 54, 727-47.

13- Van den Bosch, J.F., Hendriks. J.H. I.M. Gladigual, Williems. H.M.C. and Storn, P.K. 1993. Identification of F11 fimbriae on *Escherichia coli* strains. Infect Immun. 61, 800-806.

14- Vidotto MC., Navarro, JIR. and Gaziri. LC.J. 1997. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. Vet Microbiol. 59, 79-87.

15- Wullt: B., Bergsten: G. Connell H. Rollano P. Gebretsadik. N. Hull R. Svan borg C. 2000. P fimbria enhance the early establishment of *Escherichia coli* in the human urinary tract. Mol Microbiol. 38, 456 - 464.

16- Yano T., Gracia M. Lerte DS. Pestana. De castro AF. Shenk MA. 1995. Determination of the efficiency of k99-F41 fimbrial antigen vaccine in newborn calves. braz J Med Biol es. 28. 651-654.