

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

● رضا قنبر پور، عضو هیات علمی گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان  
● سید علی پوربخش، عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقات واکنس و سرماسازی رازی، حصارک  
● نرجس حامد شماعی، دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان

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

## مقدمه

ایزوله‌های بیماری *E. coli* در طیور و بوقلمون غالباً با سبب سستی سمی همراه بوده و باعث تلفات زیادی می‌شوند. به همین دلیل امروزه جهت شناسایی و تعیین هویت عوامل حداث *E. coli* مطالعات زیادی صورت می‌گیرد. در این میان فیمبریه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، فیمبریه یا پیلی زوائد پروتئینی و رشته‌های 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 گوندهای مختلف، به دو دسته فیمبریه حساس به مانوز<sup>۱</sup> (MSHA) یا تیپ ۱ و مقاوم به مانوز<sup>۲</sup> (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 سروزولوژی، ساختاری و عملکردی) با فیمبریه F11 موجود بر روی ایزوله‌های بیماری‌زای انسان جدا شده از موارد عفونتهای ادراری<sup>۳</sup> (UTI) دارد. اولین یافته‌ها در مورد این فیمبریه در ایزوله‌های انسانی نشان داد که ارتباطی بین هم‌گلوتیناسیون 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 شناسایی 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 ۲۷ درجه

## چکیده

در این بررسی جهت تعیین فراوانی ایزوله‌های واجد فیمبریه *E. coli*، ۳۷۰ ایزوله از موارد کلی باسیلوز طیور گوشتی جدا گردید. جهت نمود فیمبریه P هر یک از باکتریها بر روی محیط جامد شش بار پاساژ داده شد و با انجام آزمایش هم‌گلوتیناسیون با گلبولهای قرمز انسان در حضور و غیاب قند D-مانوز، ایزوله‌های مقاوم و حساس به مانوز تعیین شدند. سپس جهت شناسایی یادگن فیمبریه‌ای، تمام باکتریها به روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم نیز مورد آزمایش قرار گرفتند. در مجموع ۱۸ ایزوله در آزمایش هم‌گلوتیناسیون مقاوم به مانوز بودند که همه آنها در آزمایش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم با یادگن 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 یادگن ضد فیمبریه P (F11) واکنش نشان دادند جزو گروه سرمی 01 بودند. کلمات کلیدی: کلی باسیلوز، فیمبریه F11، *E. coli*، P، 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 Pourbakhsh, 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.

سانتیگراد افزایش می‌یابد (۵).

در سالیان اخیر استفاده از واکسن‌های ضد فیمریه‌ای 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 فیمریه‌ای در طیور با موفقیت‌هایی همراه بوده است (۷) لذا تعیین فراوانی و سروتیپ‌های شایع و همچنین تعیین نوع سرولوژیکی فیمریه 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 در مانگه 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 تایید آنها با استفاده از خصوصیات بیوشیمیایی (IMVC) اقدام گردید. بدین ترتیب ۲۷۰ باکتری جداسازی و مورد آزمایش قرار گرفت.

### شرایط نمود فیمریه P

با توجه به اینکه این فیمریه 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) (TSA) Agar 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 هم‌گلویتیناسیون

با توجه به توالی اتصال فیمریه P، برای این آزمایش از سوسپانسیون ۲٪ گلیبولهای قرمز شسته مربوط به گروه‌های خونی O و A انسانی استفاده شد. برای این منظور ابتدا مقادیر برابری از سوسپانسیون‌های باکتریایی و گلیبولهای قرمز را مخلوط نموده و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه نتیجه قرائت شد سپس ایزوله‌هایی که هم‌گلویتیناسیون را نشان دادند، جهت تعیین الگوی هم‌گلویتیناسیون آنها (حساس یا مقاوم بودن نسبت به مانوز)، آزمایش هم‌گلویتیناسیون در حضور محلول ۰/۵ قند D-مانوز (BBL) تکرار شد (۱۳).

### آزمایش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IDFAI)

برای این منظور ابتدا قطره‌ای از سوسپانسیون باکتریایی بر روی لام قرار داده شد و بعد از انجام فیکساسیون، یک قطره از پادتن خروگوشی ضد فیمریه P طیور (تهیه شده در موسسه رازی بر علیه سویه استاندارد (C1976, O1, K1, F11) با رقت ۱/۵ 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 کوژوگه فلورسین (FITC) ضد خروگوشی 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 فیمریه P:

باکتری‌هایی که در دو روش فوق واجد فیمریه ارزیابی گردیدند با استفاده از آنتی سرم‌های استاندارد (Mast diagnostics) و طبق روش پیشنهادی شرکت مذکور تعیین سروتیپ شدند. آنتی سرم‌های به کار رفته شامل ۴۳ گروه سرمی است که به صورت 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 باکتریایی با آنتی سرم‌های پلی والان مختلف مجاور شده و در مواردی که آگلوتیناسیون بروز نمود، سوسپانسیون باکتریایی با هر یک از آنتی سرم‌های منووالان دسته (پلی والان) موردنظر مجاور شد.

## نتایج

از ۲۷۰ باکتری مورد آزمایش، ۱۸ باکتری هم‌گلویتیناسیون مقاوم به مانوز را نشان دادند و در آزمایش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم نیز ۱۸ باکتری واجد فیمریه شناخته شدند. لذا فراوانی این فیمریه ۹/۴٪ 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 به صورت درخشان در آمده و پیکره باکتری چنین حالتی نداشته و تیره است که نشانگر اتصال پادتن ضد فیمریه P به قسمت اطراف (فیمریه) و متعاقباً اتصال پادتن کوژوگه است.

همانطور که در بخش قبلی اشاره شد پادتن ضد فیمریه P طیور تهیه شده در موسسه رازی بر علیه فیمریه نوع سرولوژیک F11 است که تمامی ۱۸ ایزوله MRHA+ با این پادتن واکنش نشان دادند که حاکی از مشابهت فیمریه مقاوم به مانوز طیور (P) با فیمریه F11 سویه استاندارد می‌باشد. در سروتایپینگ ایزوله‌های واجد فیمریه مشخص گردید که تمامی آنها متعلق به گروه سرمی O1 می‌باشند.

## بحث

مطالعاتی که در زمینه کلی باسیلوز طیور در طی سالیان گذشته انجام شده است حاکی از حضور هم‌گلویتیناسیون در سویه‌های *E. coli* جدا شده به‌ویژه در سرو تیپ‌های 02, 078, 01 بوده است (۳). یافته‌های بعدی نشان داد که هم‌گلویتیناسیون بواسطه وجود پلی یا فیمریه در این باکتریها بوده و از طرف دیگر ویژگیهای اتصال در سویه‌های مختلف متفاوت است که نشانگر وجود تنوع در فیمریه‌ها است (۵). با توجه به حضور فیمریه در سویه‌های پاتوژن، در سالیان اخیر مطالعات

زیادی در مورد نقش فیمریه‌ها 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 فیمریه، در مقایسه با سویه‌های بدون فیمریه از حدت بیشتری برخوردار است که این نقش از طریق عمل واسطه‌ای فیمریه‌های 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 شناسایی ساختار، عملکرد، ویژگی‌های سرولوژی و وزن مولکولی فیمریه P طیور انجام داد و با استفاده از روش ELISA میزان حضور این فیمریه را در سروتیپ‌های شایع کلی باسیلوز طیور ۹۶٪ برآورد نموده و همچنین با استفاده از روش وسترن بلائینگ نشان دادند که فیمریه P طیور مشابه نوع سرولوژیکی F11 می‌باشد که از موارد عفونت‌های ادراری انسان جدا شده است. در مطالعه مذکور با اینکه تمامی سویه‌های واجد فیمریه P متعلق به گروه سرمی O1 بودند اما احتمال حضور آن در سایر سروتیپ‌ها رد نشده است (۱۲). در سال ۱۹۹۴ پوربخش حضور فیمریه مشابهی را در سویه‌های *E. coli* جدا شده از موارد کلی باسیلوز بوقلمون گزارش نمود. لازم به ذکر است که سویه مذکور متعلق به سروتیپ O1 بوده و فیمریه 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 فیمریه P طیور را مشخص کرده و بعد از کشت سویه‌های *E. coli* طیور در محیط‌های جامد و فقیر، نسبت به ارزیابی حضور این فیمریه با استفاده از روش‌های هم‌گلویتیناسیون، ایمونوفلورسانس، ایمونودات و ایمونوبلائینگ اقدام نمود. در این مطالعه تقریباً فراوانی این فیمریه ۵ - ۳۵٪ برآورد شده است که همگی متعلق به گروه سرمی O1 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 فیمریه P، با نتایج به دست آمده در تحقیقات Dozois, Vanden Bosch و پوربخش همخوانی دارد و در مطالعات محققین یاد شده نیز فیمریه مذکور فقط در ایزوله‌های مربوط به گروه سرمی O1 شناسایی شده است. از طرف دیگر یافته‌های محققین یاد شده نیز نشان می‌دهد که فراوانی این فیمریه در گروه سرمی O1، 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 به‌دست آمده در مطالعه حاضر از نظر تعیین فراوانی حضور این فیمریه در سروتیپ‌های جدا شده از طیور تفاوت قابل توجهی با یافته‌های Vanden Bosch دارد که شاید بخاطر تفاوت در تکنیک‌های به کار رفته باشد زیرا همانگونه که ذکر شد در مطالعه مذکور از روش ELISA جهت شناسایی ایزوله‌های واجد فیمریه P استفاده شده است. نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر با یافته‌های Dozois در نظر فراوانی فیمریه P در گروه سرمی O1 مشابهت دارد اما از نظر تعیین فراوانی ایزوله‌های طیوری واجد فیمریه مذکور تفاوت دارد. در مطالعه مذکور که در حد ژنتیکی انجام شده است میزان

- 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.
- 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 fimbrial 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 Fairbrother 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 Fairbrother 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. Svanborg 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. حضور ژنهای (دسته ژنی) رمز کننده فیمریو در P<sup>+</sup> در ۳۰٪ از ایزوله‌های *E. coli* جدا شده از طیور شناسایی 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. به هر حال آنچه مسلم است نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های Dozois همخوانی بیشتری را نسبت به نتایج مطالعه 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.
- ### باورقی‌ها
- 1- Mannose sensitive hemagglutination
  - 2- Mannose resistant 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*