Archive of SID

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۱، دوره ۶۷، شماره ۱، ۹-۱

تعیین پاتوتیپ جدایه‌های اشریشیاکلی از گوساله و طیور در ایران با استفاده از روش ریزآرایه DNA

حمید استاجی [۱] تقی زهرایی صالحی [۲*] اکبر مهدیزاده دستجردی [۳] آلفردا تونلی [۴]

۱) گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان - ایران.
۲) گروه میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۳) گروه ویروس شناسی، موسسه تحقیقاتی *VLA*، ویبریج، انگلستان.
۴) گروه بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقاتی *IZS*، ترامو، ایتالیا.

(دریافت مقاله: ۲۵ اردیبهشت ماه ۱۳۹۰ ، پذیرش نهایی: ۲ مرداد ماه ۱۳۹۰)

چکیده

زمینه مطالعه: ردیابی ژن‌های مربوط به عوامل حدت که در یک سویه از اشریشیاکلی حضور دارند جهت تعیین پروفایل ژنوتیپی و همچنین قرارگیری سویه در پاتوتیپی خاص از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است. **هدف:** هدف از انجام این مطالعه تعیین پاتوتیپ جدایه های مختلف E. coli جداشده از گوساله‌ها و طیور بومی ایران با استفاده از تکنیک ریزآرایه می باشد. **روش کار:** در مطالعه حاضر تعداد ۶۷ جدایه از اشریشیاکلی پس از جداسازی، با استفاده از روش نوین ریزآرایه (DNA Microarray) جهت تعیین پاتوتیپ هر جدایه مورد بررسی قرار گرفتند. درآرایه مورد استفاده پروب‌های ژنی مرتبط با ۲۶۳ فاکتور حدت مختلف اشریشیاکلی قرار داشتند. **نتایج:** نتایج حاصل نشان دهنده این امر بود که از سویه‌های جداشده از اسهال گوساله‌ها، ۴۷ درصد به پاتوتیپ ، ۶۸/۱۵ درصد به پاتوتیپ ، ۶۸/۱۵ درصد پاتوتیپ ، ۹۶/۱درصد به پاتوتیپ ، ۹۶/۱ درصد ترکیبی از پاتوتیپ‌های و بوده و ۱۷/۶۴درصدسویه‌ها غیرقابل اختصاص به پاتوتیپی خاص بودندو در موردسویه‌های جداشده ازکلی باسیلوز طیور ۶۲/۵ درصد به پاتوتیپ، ۲۵/۳۱ درصد به پاتوتیپ و ۶/۲۵ درصدسویه‌ها غیرقابل اختصاص به پاتوتیپ خاصی بودند. **نتیجه‌گیری نهایی:** مطالعه حاضر نشان دهنده این امر می باشدکه روش نوین ریزآرایه در مقایسه با روش‌های مولکولی مرسوم قادر است تعداد بالایی از ژن‌های حدت را در یک زمان و در مدت زمان کوتاهی بخوبی ردیابی کرده و در تعیین پروفایل ژنتیکی و تعیین پاتوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلی، عوامل حدت، پاتوتیپ، روش ریزآرایه DNA.

مقدمه

گونه اشریشیاکلی (*E.coli*) باکتری میله‌ای شکل و گرم منفی از خانواده آنتروباکتریاسه می‌باشد که بصورت همزیست درون دستگاه گوارش انسان و حیوانات خونگرم زندگی می‌کند (۲۳). سویه‌های بیماریزای این باکتری در مقایسه با سویه‌های غیربیماریزا واجد عوامل حدت خاصی هستند که آنها را قادر می‌سازد طیف وسیعی از بیماری‌ها را در انسان و حیوانات (۱) از قبیل اسهال، عفونت‌های دستگاه ادراری، باکتریمی و مننژیت نوزادان ایجاد کنند (۲۳). سویه‌های بیماریزای اشریشیاکلی را می توان بواسطه حضور ژن‌های حدت که رمزکننده عوامل اتصالی و موضعی شدن باکتری، تهاجم، مولکول‌های سطحی، مواد ترشحی، ترکیبات انتقال دهنده متابولیت‌ها و سیدروفورها هستند، از انواع غیر بیماریزا متمایز نمود (۱۱). ژن های حدت معمولاً درون جزایر بیماریزایی کروموزوم، پلاسمیدها و یا فاژها که جزء عناصر ژنتیکی سیار و قابل انتقال هستند، قرار می‌گیرند (۲،۱۳) و به همین دلیل ژنوم اشریشیاکلی از لحاظ حضور ژن‌های حدت مختلف بسیار متنوع بوده و این خصوصیات باعث می‌شود باکتری، ژن هایی را از دست داده و یا از دیگر سویه‌های بیماریزای گونه اشریشیاکلی طی روندی تحت عنوان انتقال جانبی ژن شها کسب نموده (۹،۲۲) و منجر به ایجاد پاتوتیپ‌هایی متفاوت با ترکیب ژن‌های حدت جدید گردد (۲۴).

سویه‌های مختلف اشریشیاکلی براساس حضور یا عدم حضور عوامل حدت، نوع آنها و همچنین علایم بالینی ایجاد شده در میزبان به پاتوتیپ‌های مختلفی تقسیم بندی می‌شوند که عبارتند از:

EPEC (Enteropathogenic *E. coli*) عامل ایجاد کننده اسهال در اطفال و حیوانات، EHEC (Enterohemorrhagic *E. coli*) عامل ایجاد کولیت خونریزی دهنده و سندروم همولیتیک - اورمیک در انسان، ETEC (Enterotoxigenic *E. coli*) عامل بیماری اسهال مسافران در انسان و اسهال گاو و خوک، EAEC (Enteroagreggative *E. coli*) عامل ایجاد اسهال پایدار در انسان، DAEC (Detaching-Affacing *E. coli*) بعنوان زیر رده‌ای از پاتوتیپ EAEC و مسئول ایجاد اسهال در اطفال، EIEC (Enteroinvasive *E. coli*) عامل اسهال آبکی و دیسانتری در انسان، UPEC (Uropathogenic *E. coli*) عامل ایجاد عفونت‌های دستگاه ادراری در انسان و حیوانات، NMEC (meningitides *E. coli* Neonatal) عامل ایجاد کننده عفونت خونی و مننژیت در نوزادان انسان و حیوانات و APEC (Avian pathogenic *E. coli*) عامل ایجاد کننده بیماری کلی باسیلوزیس در طیور با علایم تورم کیسه‌های هوایی، سلولیت

(*) نویسنده مسئول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۵۲-۰۲۱ نمابر: ۶۶۴۲۷۵۱۷-۰۲۱ Email: tsalehi@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

و عفونت خونی، که البته سویه‌های بیماریزا در طیور را جزء *E. coli* بیماریزای خارج روده‌ای (Extraintestinal pathogenic *E. coli*) ExPEC نیز دسته بندی می نمایند. (۱۹،۲۰،۲۷،۲۸،۳۳).

روش های متعددی جهت ردیابی *E. coli* بیماریزا شامل آزمون های نشانگرهای فنوتیپی و ژنوتیپی به منظور ردیابی ژن های حدت و محصولات آنها در دسترس بوده (۷،۲۱،۲۶،۳۱) و این روش ها قادرند که فقط تعداد محدودی از این عوامل حدت را در یک زمان تعیین نمایند (۱)، امافن آوری ریزآرایه (DNA Microarray) DNA یا فن آوری تراشه ژنی (DNA Chip) این امکان را فراهم می سازد که بصورت جامع، هزاران ژن را که پروب یا ردیف های آنها در سطح یک لام میکروسکوپی قرار گرفته اند، در یک زمان در یک سویه از *E. coli* غربالگری نموده و از آنها در گروه بندی و تمایز پاتوژن های باکتریایی و تعیین عوامل حدت آنها استفاده نمود (۱،۴،۱۲،۳۰،۳۱،۳۴،۳۵).

هدف از انجام این مطالعه تعیین پاتوتیپ سویه های *E.coli* جداشده از نمونه های مربوط به اسهال گوساله ها و کلی باسیلوزیس طیور ارجاعی به آزمایشگاه گروه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران بود که این امر از طریق ردیابی تعداد ۲۶۳ عدد از ژن های مرتبط با عوامل حدت و انواع مختلف این عوامل از قبیل آدزین ها، سموم، ترکیبات دخیل در اخذ و انتقال آهن، عوامل رمز شده توسط جایگاه ژنی محو کننده آنتروسیت های روده، کلیسین ها (Colicins) و میکروسین ها (Microcins)، پادگن های سوماتیک و کپسولی، همولیزین ها و هماگلوتینین ها، عواملی با عملکردهای متفاوت و عوامل حدتی که اخیرا در این گونه شناسایی شده اند و می توانند در بیماریزایی دخیل باشند، انجام پذیرفت.

مواد و روش کار

جداسازی، تعیین سروتیپ و استخراج DNA از ژنوم سویه‌های اشریشیاکلی: تعداد ۶۷ سویه از باکتری اشریشیا کلی از گوساله های مبتلا به اسهال (۵۱ جدایه) و طیور مبتلا به کلی باسیلوزیس (۱۶ جدایه) براساس روش های کشت و بیوشیمیایی مرسوم جداسازی شده و سپس سروتیپ مربوط به هر جدایه با استفاده از آنتی سرم های اشریشیا کلی بیماریزا، محصول شرکت (Diagnostics, EA) "MAST ASSURE" و مطابق با پروتکل آن تعیین شدند. سپس DNA ژنومی هر نمونه با استفاده از کیت AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (BIONEER, Korea) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد.

نشان گذاری DNA (DNA Labelling): میزان کمّی (DNA Quantity) استخراج شده از نمونه ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Nanodrop Technologies, Celbio Srl., Milan, Italy) Nanodrop® اندازه‌گیری شد. سپس مقادیر DNA در بازه ۳۰۰ نانوگرم تا ۳ میکروگرم از هر نمونه برداشت شده و به حجم ۲۱ میکرولیتر رسانده شده و با استفاده از دستگاه دسیکاتور (ArrayIt, USA) Savant SpeedVac®, نمونه ها خشک شده و نهایتاً در آب مقطر با درجه خلوص بالا (GMBH, Germany) دوباره بصورت تعلیق درآمده و به حجم ۲۱ میکرولیتر رسانده شدند. سپس ژنوم استخراج شده از نمونه ها با استفاده از کیت نشان‌گذاری (Life Technologies, Milano, Italy) Invitrogens Bioprime® (Invitrogen و مطابق با پروتکل ارائه شده توسط (Bruant et al., 2006) نشانه گذاری شدند. میزان کارایی روند نشان گذاری و درصد ورود رنگ در نمونه ها از طریق جذب نوری ژنوم نشان گذاری شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Nanodrop® در طول موج ۵۵۰ نانومتر و با استفاده از نرم افزار online مربوطه <tp://www.pangloss.com/seidel/Protocols/percent_inc.html>. <ht اندازه گیری شد. مطابق با مرجع (Bruant et al., 2006) نمونه هایی که درصد ورود رنگ در ژنوم نشان‌گذاری شده آنها بین ۱۰-۸ درصد باشد جهت انجام مراحل آمیخته‌گری مناسب هستند و برای انجام مراحل بعدی انتخاب می شدند.

ریزآرایه الیگونوکلئوتیدی ژن‌های حدت (probes Virulence genes oligonucleotide): Bruant و همکاران در سال ۲۰۰۶ یک ریزآرایه الیگونوکلئوتیدی را برای تشخیص پاتوتیپ های شناخته شده *E. coli* طراحی نمودند. در این آرایه پروب هایی متشکل از ۷۰ نوکلئوتید برای تعداد ۲۶۳ ژن حدت، مربوط به پاتوتیپ های مختلف گونه اشریشیاکلی) تعداد ۱۰۹ ژن حدت مشترک بین پاتوتیپ های مختلف و ۱۵۴ ژن حدت اختصاصی پاتوتیپ های خاص مطابق جدول یک) و بصورت دوبار تکرار (Duplicate) در سطح لام های میکروسکوپی حضور دارند که در مطالعه حاضر از این آرایه ها جهت تعیین پاتوتیپ جدایه های *E. coli* استفاده شد.

آمیخته‌گری (Hybridization): جهت انجام مراحل آمیخته گری از دستورالعمل ذکر شده مطابق پروتکل Bruant و همکاران در سال ۲۰۰۶ استفاده شد، به این ترتیب که برای انجام هر مرتبه آمیخته گری مقادیر ۵۰۰ نانوگرم از DNA نشان گذاری شده تحت شرایط خلاء درون دسیکاتور چرخشی (Savant SpeedVac®, ArrayIt, USA) خشک شده و سپس نمونه های خشک شده درون بافر آمیخته‌گری حاوی ۴۰۰ میکرولیتر Dig Ease Buffer (Diagnostics s.p.a., Milan, Italy Roche)، ۲۰ میکرولیتر tRNA مخمر Baker و ۲۰ میکرولیتر DNA اسپرم ماهی سالمون سونیکه شده (Sigma Aldrich spa, Milan, Italy) (10 mg/ml) دوباره بصورت تعلیق درآمده و توسط این بافر به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده می شدند. قبل از انجام آمیخته‌گری، لام های ریزآرایه برای مدت زمان حداقل یک ساعت در بافر پیش آمیخته گری (1.0% BSA 5X SSC, 0.1% SDS and) که قبلا به دمای ۵۰ درجه سانتیگراد رسیده بودند قرار داده شده و پس از طی این زمان، آمیخته گری به این صورت انجام می‌گرفت که اسلایدهای حاوی پروب ها درون دستگاه آمیخته‌گری

www.SID.ir

Archive of SID

SlideBooster® (Advalytix, ABI, Milan, Italy) قرار گرفته و پس از آن نمونه نشان‌گذاری شده درون بافر آمیخته گری روی آرایه قرار داده شده و اسلایدها به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد جهت تکمیل مرحله آمیخته‌گری، گرم خانه‌گذاری می‌شدند. پس از طی مدت زمان آمیخته‌گری لام‌ها با استفاده از محلول (ABI, Milan, Italy Advawash® (Advalytix, حاوی (1X SSC, 0.02% SDS) که به دمای ۵۰ درجه سانتیگراد رسیده بود شستشو شده و بلافاصله توسط دستگاه اسکنر ScanArray® و نرم افزار (Perkin Elmer, Milan, Italy ScanArray Gx software® اسکن شده و تصاویر اخذ شده توسط نرم افزار QuantArray® (Perkin Elmer, Milan, Italy) جهت تعیین حضور ژن‌های حدت در نمونه‌ها بصورت تصویر ۱ توسط این نرم افزار کسب شده و مورد آنالیز قرار گرفتند.

نتایج

نتایج سروتایپینگ: تعداد ۶۷ سویه از باکتری اشریشیا کلی جدا شده از موارد اسهال گوساله‌ها (۵۱ جدایه) و کلی باسیلوز طیور (۱۶ جدایه) مطابق پروتکل ذکر شده تعیین سروتیپ شدند که نتایج آن در جدول ۱و۲ ذکر گردیده است. در بین سویه‌های جدا شده از موارد اسهال گوساله‌ها سروتیپ‌های O2 (۷/۸۴درصد)، O18 (۳/۹درصد)، O20 (۳/۹درصد)، O26 (۱۹/۶ درصد)، O44 (۲۳/۵۲درصد)، O45 (۳/۹ درصد)، O55 (۱/۹۶درصد)، O86 (۱/۹۶ درصد)، O111 (۱۵/۶۸ درصد)، O126 (۱/۹۶ درصد)، O157 (۳/۹ درصد) و در مورد برخی جدایه‌ها غیرقابل تعیین سروتیپ (۱۱/۷۶درصد) مشاهده شده و در بین جدایه‌های مربوط به کلی باسیلوز طیور سروتیپ‌های O2 (۳۱/۲۵درصد)، O78 (۴۳/۷۵درصد) و غیرقابل تعیین سروتیپ (۲۵ درصد) مشاهده شدند.

تعیین پاتوتیپ جدایه‌ها با استفاده از روش ریزآرایه DNA: لام‌های ریزآرایه استفاده شده در این مطالعه توسط Bruant و همکاران در سال ۲۰۰۶ از لحاظ کارآیی و توانایی در تعیین پاتوتیپ‌های اشریشیا کلی با استفاده از سویه‌های استاندارد با پاتوتیپ مشخص، ارزیابی شده‌اند و کارایی و صحت نتایج آنها مورد تایید قرار گرفته بود.

بعد از انجام آمیخته‌گری روی لام‌های ریزآرایه، تصویر اخذ شده از دستگاه اسکنر توسط نرم افزار ®Quantarray مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و سپس با استفاده از نرم افزاری تحت زبان برنامه‌ریزی جاوا (Java) نتایج مطابق تصویر ۱ از این نرم افزار بصورت کلاستر (خوشه) اخذ شده و قابل ذکر است که تمامی نمونه‌های نام برده در جدول ۱و۲ با تمام چهار پروب مربوط به شاهد مثبت، واکنش مثبت نشان داده و با هیچ یک از پروب‌های شاهد منفی واکنشی نداشته و به این ترتیب در اولین مرحله اشریشیا کلی بودن آنها مورد تایید قرار گرفته و سپس از لحاظ حضور ژن‌های حدت قید شده در جدول ۱مورد ارزیابی قرار می‌گرفتند. در تصویر یک در هر ستون ژن‌های مربوط به یک نمونه که مورد بررسی قرار گرفته‌اند ذکر شده و موارد واکنش مثبت به رنگ قرمز، واکنش منفی به رنگ سبز و موارد مشکوک به رنگ سیاه به نمایش گذاشته شده‌اند و بدلیل حجم و اندازه بالای تصویر اخذ شده فقط بعنوان نمونه قسمتی از تصویر دریافتی به نمایش درآمده است. در جدول ۱و۲ فقط ژن‌های حدت اختصاصی موجود در پاتوتیپ‌های خاص که در نمونه‌ها ردیابی شدند نمایش داده شده اند و قابل ذکر است که ژن‌های حدت مشترک بین پاتوتیپ‌های مختلف که در نمونه‌ها ردیابی شده‌اند به منظور فشرده‌سازی نتایج در جدول ۱و۲ و محدودیت در فضای نوشتاری از ذکر آنها در جدول نتایج خودداری شده است.

پس از انجام آزمون ریزآرایه DNA جهت تعیین پاتوتیپ جدایه‌های *E. coli* از موارد اسهال گوساله‌ها، نتایج به این ترتیب می‌باشد که ۴۷درصد سویه‌ها مربوط به پاتوتیپ EHEC، ۱۵/۶۸ درصد مربوط به پاتوتیپ EPEC، ۱۵/۶۸ درصد مربوط به پاتوتیپ UPEC، ۱/۹۶درصد مربوط به پاتوتیپ ETEC، ۱۷/۶۴درصد غیرقابل اختصاص به پاتوتیپی خاص و یک مورد (۱/۹۶درصد) از لحاظ حضور پروب‌های اختصاصی هر دو پاتوتیپ EPEC و UPEC مثبت شناسایی شده و در مورد نمونه‌های اخذ شده از طیور ۶۲/۵ درصد مربوط به پاتوتیپ APEC، ۳۱/۲۵درصد مربوط به پاتوتیپ ExPEC و در یک مورد (۶/۲۵درصد) ژن‌های پاتوتیپی خاص ردیابی نشده و قابل اختصاص به هیچ پاتوتیپی نبود.

در مورد سویه‌های جدا شده از موارد بالینی اسهال گوساله‌ها، پاتوتیپ EHEC در سروتیپ‌های O45, O157, O44, O55, O26, O18, O111 و یک نمونه با سروتیپ نامشخص که البته از لحاظ حضور ژن lpfA(O113) مثبت بوده و احتمالاً به این سروتیپ تعلق دارد، مشاهده شده و پاتوتیپ EPEC در سروتیپ‌های O111, O20, O44, O2 و O26 قرار داشته و اعضای پاتوتیپ UPEC در سروتیپ‌های O2, O44 و O45 و همچنین یک نمونه بعنوان پاتوتیپ ETEC تعیین شد که سروتیپ آن مشخص نبوده و در یک نمونه نیز ژن‌های اختصاصی مربوط به پاتوتیپ‌های EPEC و UPEC ردیابی شد که احتمالاً در آن نمونه سویه‌های مربوط به هر دو پاتوتیپ حضور داشته‌اند. از موارد اشریشیا کلی مربوط به اسهال گوساله‌ها ۹ جدایه بدلیل عدم حضور و یا اندک بودن ژن‌های اختصاصی پاتوتیپی خاص به هیچ یک از پاتوتیپ‌ها اختصاص نداشتند.

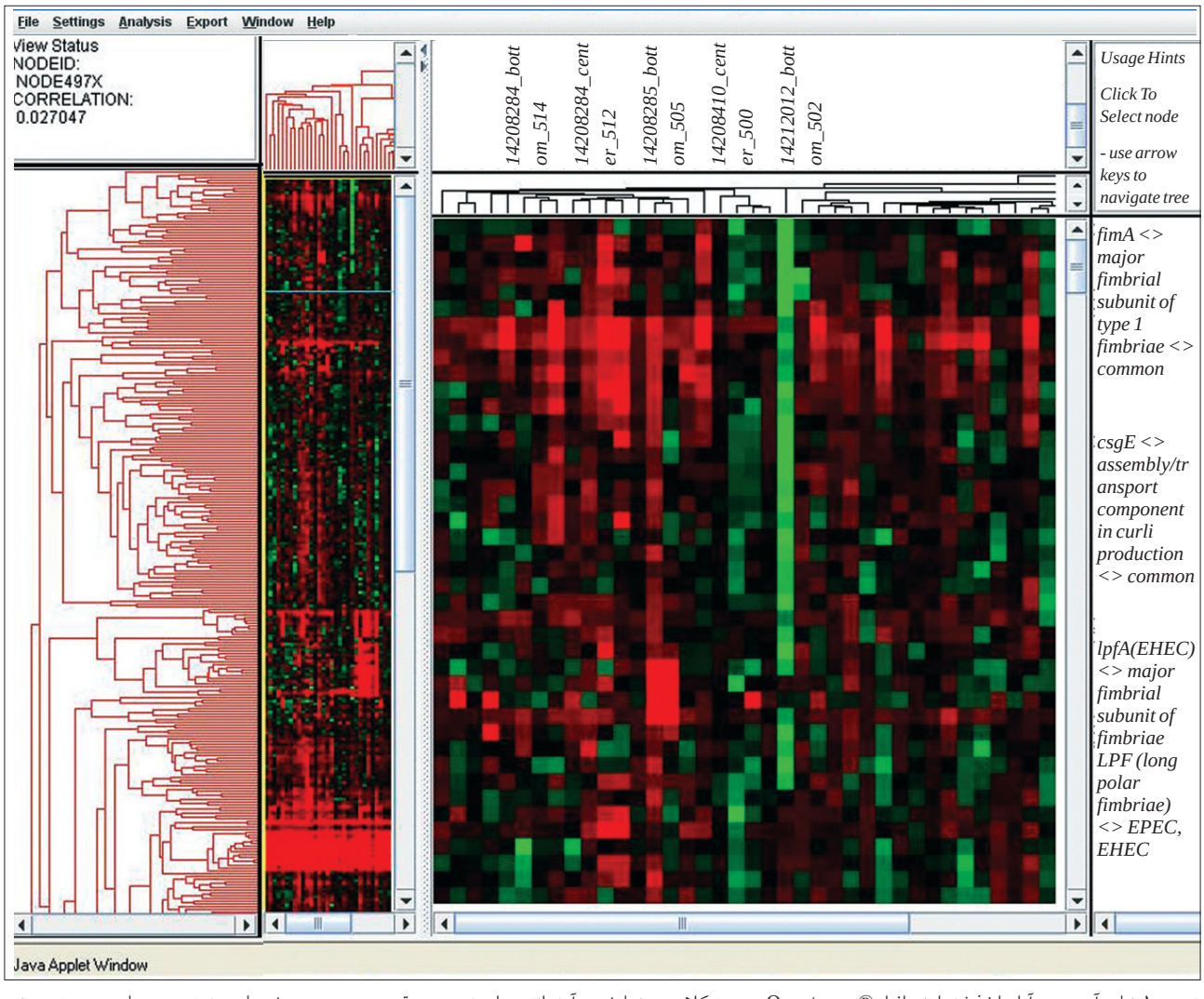
در جدایه‌های مربوط به کلی باسیلوز طیور نیز پاتوتیپ‌های APEC و ExPEC در هر دو سروتیپ O2 و O78 مشاهده شده و یک نمونه نیز بدلیل عدم ردیابی ژن‌های اختصاصی پاتوتیپی خاص، قابل اختصاص به هیچ یک از پاتوتیپ‌ها نمی‌باشد.

بحث

ردیابی تعیین کننده‌های حدت که در ژنوم اشریشیا کلی بیماریزا قرار دارند جهت تعیین پاتوتیپ ایجاد کننده بیماری و علایم بالینی در میزبان از

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۱- نتایج آزمون ریزآرایه اخذ شده از نرم افزار Quantarray® بصورت کلاستر به نمایش در آمده اند. در این تصویر در قسمت سمت چپ ژن های حدت مورد ردیابی بصورت ستونی ذکر شده اند و همانطور که در تصویر مشخص است ژن هایی که حضور آنها در یک نمونه به یکدیگر وابسته بوده و یا بهم نزدیک می باشند کنار یکدیگر از لحاظ فیلوژنیک قرار داشته و در قسمت بالای تصویر شماره هر نمونه ذکر شده است. در این تصویر مربوط به کلاستر بصورت خودکار نمونه هایی که از لحاظ حضور ژن های حدت مختلف مشابه بوده و یا بهم نزدیک هستند نیز از لحاظ فیلوژنیک در یک گروه قرار می گیرند و هرچه نمونه ها از یکدیگر متفاوت تر باشند در این دسته بندی فیلوژنیک از یکدیگر دورتر قرار گرفته اند. در قسمت سمت راست تصویر نیز نام ژن های مورد بحث به همراه عملکرد هر ژن در سمت چپ آورده شده است. همچنین قابل ذکر است که در بخش رنگی سمت چپ داخل تصویر ۱، در قسمت پایین که پروب های شاهد مثبت قرار دارند، همه نمونه ها از حضور ژن های شاهد مثبت، مثبت نمایش داده شده اند که بنوعی صحت و کارآیی این روش نوین را در ردیابی ژن های مختلف نشان می دهد.

اهمیت فوق العاده ای برخوردار بوده (۱) و تاکنون چندین ریزآرایه مرتبط با ژن های حدت اشریشیا کلی بمنظور تعیین ژنوتیپ سویه های اشریشیا کلی مورد استفاده قرار گرفته و در تمامی این مطالعات مشخص شده است که روش ریزآرایه DNA بدلیل ردیابی تعداد بالایی از ژن های حدت این باکتری بعنوان ابزار قدرتمندی با صحت و کارایی بالا در مقایسه با دیگر روش های مولکولی که در یک زمان قادرند فقط تعداد محدودی از ژن ها و فاکتورهای حدت را ردیابی نمایند مطرح می باشد (۳،۵،۱۶).

Muna F Anjum و همکاران در سال ۲۰۰۷ و همچنین Palaniappan و همکاران در سال ۲۰۰۶ با استفاده از طراحی نوعی آرایه DNA با فرمت داخل لوله ای و ردیابی تعدادی از ژن های حدت اختصاصی پاتوتیپ ها و تعدادی از ژن های مشترک توانستند با آزمودن برخی سویه های اشریشیا کلی جدا شده از موارد مختلف بیماری های بالینی انسان و حیوانات پاتوتیپ اکثر سویه ها را مشخص نموده و همچنین آرایه های مورد نظر را با استفاده از سویه های استاندارد با پاتوتیپ مشخص ارزیابی نمودند و در مطالعات آنها برخی سویه ها غیر قابل تعیین پاتوتیپ بوده و یا به عبارتی به هیچ کدام از پاتوتیپ ها اختصاص نداشتند (۱،۲۳) که این حالت در مطالعه حاضر نیز رخ داده و از بین ۵۱ سویه مربوط به موارد اسهال گوساله ها ۹ مورد و از ۱۶ نمونه اشریشیا کلی جدا شده از کلی باسیلوز طیور یک مورد به هیچ یک از پاتوتیپ ها تعلق نداشتند.

Korczak و همکاران در سال ۲۰۰۵ با استفاده از روش ریزآرایه تعدادی از ژن های حدت مرتبط با سویه های بیماریزای روده ای و غیر روده ای *E. coli* را در جدایه های مختلف این باکتری با منشاء متفاوت ردیابی نموده و

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- ژن های حدت اختصاصی ردیابی شده مربوط به پاتوتیپ های مختلف (اسهال گوساله ها).

شماره نمونه	سروتیپ	ژن های حدت اختصاصی ردیابی شده مربوط به پاتوتیپ های مختلف (اسهال گوساله ها)	پاتوتیپ
37	O18	*lpfA,lpfA(EHEC),efa1,eae,eae(beta),espA-1,espB-3,tir-1, paa,stx1A,stx1B,irp2,fyuA,wzy(O26),ehxA,cif,espP,malX,set,ureD,nleA(EHEC),nleb,nleE,nleF,nleG*	EHEC
5-B	O18	*chuA,fepC,irp2,lpfA,eaf ,ibeA,malX,tibC,*	نامشخص
237	O2	*bfpA(beta),focG,lpfA(O113),afaE7,hra1,*	EPEC
C-A	O2	*chuA,fepC ,iroN,fyuA,kpsM-II,f165(1)A ,papA(11),papC,malX,usp,papGII*	UPEC
C-B	O2	*chuA,iroN,fyuA,irp1,irp2,kpsM-II ,papA(11),papC,malX,papGII*	UPEC
C-C	O2	*chuA,fepC,iroN,fyuA,irp1,irp2,kpsM-II,f165(1)A,papA(11),papC,malX,tibC,usp,papGII*	UPEC
H	O26	*wzy(O86),lpfA,lpfA(O113),spaS*	EHEC
D	O26	*stx1A,fyuA,irp2,lpfA,lpfA(EHEC),ehxA,cif, efa1,espP,set,ureD,eae,eae(beta),espA-1,espB-3,ler,nleA(EHEC),nleb(O157),nleF,nleG,paa,spaS*	EHEC
C	O26	*wzy(O26),lpfA,lpfA(EHEC),capU,cif, efa1,set,shf,ureD,virK,eae,eae(beta),espA-1,espB-3,tir-1,nleA(EHEC),nleF,nleG,paa*	EHEC
A	O26	*stx1A,stx1B,fyuA,irp1,irp2,wzy(O26),lpfA(EHEC),cif,efa1,malX,set,ureD,eae,eae(beta),espA -1,espB-3,tir-1,ler,nleA(EHEC),nleF,nleG,paa*	EHEC
L	O26	*stx1A,stx1B,wzy(O26),lpfA,lpfA(EHEC),ehxA,efa1,espP,set,ureD,eae,eae(beta),espA -1,espB-3,tir-1,ler,nleA(EHEC),nleF,nleG,*	EHEC
N	O26	*stx1A,stx1B,fyuA,wzy(O26),lpfA,lpfA(EHEC),papA,cif,efa1,malX,tibC,set,ureD,eae,eae(beta), espA-1,espB-3,tir-1,ler,escJ,nleA(EHEC),nleb,nlec,nleF,paa,spaS*	EHEC
36	O26	*stx1A,stx1B,lpfA(EHEC),ehxA,cif ,efa1,malX,set,ureD,eae,eae(gamma),espA-1,espB-2,tir-3,ler,escJ,nleb,paa,*	EHEC
32	O26	*stx1A,stx1B,wbdI,lpfA(EHEC),ehxA,cif ,efa1,malX,tibC,set,ureD,eae(gamma),espA -1,espB-2,tir-3,ler,escJ,nleA(EHEC),nleb,nlec,nleG,paa,spaS,*	EHEC
10-2	O26	*stx1A,stx1B,fyuA,wzy(O26),lpfA(EHEC),ehxA,cif,efa1,espP,katP,malX,set,ureD,eae(beta),espA -1,espB-3,tir-1,ler,escJ,nleA(EHEC),nleb,nlec,nleG,spas*	EHEC
7-B	O26	*stx1A,stx1B,fyuA,irp2,wzy(O26),lpfA(EHEC),papA(7-2),papA(14),cif,efa1,malX,tibC, set,ureD,eae(beta),espA-1,espB-3,tir-1,tir-3,ler,escJ,nleA(EHEC),nleb*	EHEC
801	O55	*cnf2,stx1A,stx1B,wzy(O55),ralG,bfpA(alpha),bfpA(beta),CS3,lpfA(EHEC),papC,papGI,hlyA*	EHEC
748	O44	*csgE,fimA,fimH,hlyE,fliC,gad,ompA,artJ,b1121*	نامشخص
373	O44	*csgE,gafD,fimA,fimH,lpfA,hra1,agn43,fliC,gad,ibeB,ompA,artJ,mviM,mviN,tspE4.C2*	EPEC
20	O44	*chuA,fepC,iroN,kpsM-II,lpfA*	UPEC
34	O44	*stx1A,stx1B,chuA,fepC,fyuA,irp2,rfbE,lpfA(EHEC),ehxA,cif,efa1,espP,etpD, katP,malX,L7095,rtx,set,ureD,eae(beta),eae(gamma2) ,tir-1,ler,nleA(EHEC),paa*	EHEC
33	O44	*stx1A,chuA,lpfA,katP,ureD,eae,espA-2,espB-1,ler,escJ ,nleA(EHEC),nlec,nleD,*	EHEC
31	O44	*chuA,fepC,rfbE,lpfA,ehxA,efa1,espP,etpD,katP,rtx,set,ureD,eae(gamma2),espA -2,espB-1,ler,escJ,nleb,nlec,nleD,nleF,paa*	EHEC
3	O44	*stx1A,chuA,lpfA,etpD,set,ureD,eae,espA-2,escJ,*	EHEC
403	O44	*faeGac,tibC,spas*	نامشخص
805	O44	*chuA,fepC,lpfA,papA(14),shf*	UPEC
800	O44	*iroN,lpfA*	نامشخص
738	O44	*lpfA,ehxA,cif,efa1,eae,eae(beta),espA-1,espB-3,tir-1,ler ,nleF,paa,*	EPEC
737	O44	*lpfA*	نامشخص
169	O86	*wzy(O86),f165(1)A,lpfA,papA(11),papC,capU,espP,shf,virK*	نامشخص
F	O111	*stx1A,stx1B,wbdI ,lpfA(EHEC),ehxA,cif ,efa1,set,ureD,eae(gamma),espA-1,tir-3,ler,nleb,*	EHEC
B4	O111	*iroN,f165(1)A,lpfA,papA(11),papC,papGII,*	EPEC
AB	O111	*iroN,f165(1)A,lpfA,papA(7-2),papA(11),papC,tibC,papGII,tir-3,spaS,*	EPEC-UPEC
8	O111	*f165(1)A,lpfA,papC,espP,*	EPEC
758	O111	*stx1A,stx1B,wbdI,lpfA(EHEC),ehxA,cif,efa1,set,ureD,eae,eae(gamma),espA-1,tir-3,ler,*	EHEC
755	O111	*stx1A,stx1B,wbdI,lpfA,lpfA(EHEC),ehxA,set,ureD,eae,eae(gamma),espA-1,ler,nleb,*	EHEC

www.SID.ir

Archive of SID

شماره نمونه	سروتیپ	ژن های حدت اختصاصی ردیابی شده مربوط به پاتوتیپ های مختلف (اسهال گوساله ها)	پاتوتیپ
350	O111	*stx1A,stx1B ,wbdI,lpfA(EHEC),ehxA,efa1,malX,set,ureD,eae,eae(gamma),espA -1,espB-2,tir-3,ler,escJ,nleA(EHEC),nleb,nlec,nleG,paa,*	EHEC
337	O111	*fyuA,irp1,irp2,lpfA(EHEC),ehxA,cif,efa1,malX,set,ureD,eae,eae(beta),espA -1,espB-3,tir-1,ler,nleA(EHEC),nleb,nleC,nleD,nleF,nleG,paa*	EHEC
35	O45	*stx1A,stx1B,lpfA(EHEC),ehxA,cif ,efa1 ,malX, set,ureD,eae(gamma),espA-1,espB-2,tir-3,ler,escJ,nleA(EHEC),nleb,nleC,nleG,paa,*	EHEC
231	O45	*kpsM-II,wzy(O45K1),csnA,malX ,tia,pixA,*	UPEC
239	O126	*All positive genes are for common virulence factors*	نامشخص
247	O20	*leoA,iroN,lpfA,papA(12),papC,capU,tia,tibC,shf,virK,papGII,papGII,*	EPEC
164	O20	*lpfA*	نامشخص
O157-A	O157	*stx1A,stx1B,stx2A,stx2B-1,chuA,fepC,rfbE,lpfA(O157),wzy(O157:H7),ehxA,efa1,espP, etpD,katP,ECs1282,L7095,rtx,set,ureD,eae(gamma2),espA-2,espB-1,ler*	EHEC
19	O157	*stx1A,stx1B,chuA,fepC,rfbE ,lpfA(O157),ehxA,efa1,espP,etpD,katP, tibC,rtx,set,ureD,eae(gamma2),paa ,nleA(EHEC),nleb(O157),nlec(O157),nleD,nleF,nleG*	EHEC
387	نامشخص	*fyuA,irp1,irp2,lpfA,ehxA,cif,efa1,set,eae(beta),espA-1,tir-1,ler,nleA,nleC,nleG*	EPEC
244	نامشخص	*leoA,iroN,fedA,lpfA,papA(12),papC,tia,papGII,*	UPEC(?)
799	نامشخص	*chuA,kpsM-II*	UPEC(?)
790	نامشخص	*All positive genes are for common virulence factors*	نامشخص
756	نامشخص	*stx1A,stx1B,lpfA(EHEC),lpfA(O113),set,ureD,eae,eae(gamma),espA-1,ler,nleb*	EHEC (O113)
745	نامشخص	*LT-IIaA,cdtB-3,cnf2,hlyA,fimA,fimH,traT,artJ*	ETEC

جدول ۲- ژن های حدت اختصاصی ردیابی شده در نمونه های کلی باسیلوزیس طیور در مورد تمامی نمونه ها فقط ژن های حدت اختصاصی پاتوتیپ های مختلف که ردیابی شده اند ذکر گردیده و از ذکر ژن های حدت ردیابی شده و مشترک بین تمامی پاتوتیپ ها صرف نظر شده است.

شماره نمونه	سروتیپ	ژن های حدت اختصاصی ردیابی شده مربوط به پاتوتیپ های مختلف (اسهال گوساله ها)	پاتوتیپ
6_1	نامشخص	*iutA(2),fimA,fimH,lpfA,papC,hlyE,hra1,ibeB,iss,malX,ompA,ompT,traT,mviM,mviN*	ExPEC
26	نامشخص	*chuA,fepC,fyuA,lpfA,tsh,vat,ibeA,malX,*	APEC/ExPEC
14	نامشخص	*chuA,fyuA,irp1,irp2,lpfA,tsh,vat,ibeA,malX,*	APEC/ExPEC
11	O2	*iroN,iroN(2),lpfA,hlyE,hra1*	APEC/ExPEC
i	O2	*iroN,lpfA,hlyE,tsh,*	APEC/ExPEC
B	O2	*chuA,fepC,iroN,fyuA,irp2,lpfA,papC,tsh,malX ,papGII,*	APEC/ExPEC
P	O2	*iroN,irp2,lpfA,tsh,*	APEC/ExPEC
512	O2	*iroN,lpfA,csgA,csgE,ompA,TraT,mviN,astA*	ExPEC
514	O2	*All positive genes are for common virulence factors*	نامشخص
J	O78	*iroN,iroN(2),lpfA,tsh*	APEC/ExPEC
M	O78	*iroN,f165(1)A,lpfA,papA(11),papC,tsh,papGII,*	APEC/ExPEC
Madani-1	O78	*iroN,lpfA,tsh,spaS,hlyE*	APEC/ExPEC
Madani-2	O78	*iroN,lpfA,tsh,spaS*	APEC/ExPEC
500	O78	*iroN,iut,kpsM II*	ExPEC
501	O78	*iroN,lpfA*	ExPEC
504	O78	*iroN,lpfA,hlyE,hra1*	ExPEC

دریافتند که برخی تعیین کننده‌های حدت موجود در سویه‌های بیماریزای روده‌ای در جدایه‌های بیماریزای خارج روده‌ای نیز حضور دارند که این امر می تواند بدلیل طبیعت همزیست بودن این اجرام در محیط دستگاه گوارش و همچنین حضور و پیوستگی برخی ژن‌ها با یکدیگر در پلاسمیدها و کروموزوم باکتری باشد (۱۵،۱۷،۲۵) و در مطالعه حاضر این امر به نوعی مشاهده می شود، زیرا برخی سویه‌های جدا شده از موارد

www.SID.ir

Archive of SID

اسهال گوساله‌ها دارای تعیین کننده‌های حدت اعضاء پاتوتیپ UPEC بودند و این پاتوتیپ جزء بیماریزاهای خارج روده‌ای تقسیم بندی می‌شود.

در مطالعه حاضر تعداد زیادی از ژن‌های حدت مشترک بین پاتوتیپ‌های مختلف در نمونه‌های متفاوت با پاتوتیپ مشخص، مشاهده شده و این حالت در تمامی مطالعات قبلی که به‌منظور تعیین پاتوتیپ و ژنوتیپ سویه‌های مختلف اشریشیا کلی انجام گرفته مشاهده شده است (۱،۳،۱۶،۲۳).

مطابق مطالعات انجام گرفته بیشترین پاتوتیپ‌هایی که در دستگاه گوارش حیوانات ردیابی شده اند شامل EPEC, EHEC و ETEC بوده (۱۸،۱۹،۲۷،۲۸) و در مطالعه حاضر علاوه بر این پاتوتیپ‌ها، سویه‌هایی از پاتوتیپ UPEC نیز مشاهده می‌شوند.

پاتوتیپ ETEC رایج ترین پاتوتیپی است که باعث ایجاد اسهال در چند روز اول تولد گوساله‌ها شده و این اجرام بیماریزایی خود را از طریق اتصال به یاخته‌های مخاطی دستگاه گوارش بواسطه آدزین‌های F18 F4, F5, F6, F17, و F41 و همچنین تولید سموم روده‌ای حساس به حرارت (LT) و مقاوم به حرارت (ST) که توسط پلاسمیدها رمزدهی می‌شوند، انجام می‌دهند (۱۹).

در برخی مراجع برای اعضای پاتوتیپ‌های EPEC و EHEC مکانیسم بیماریزایی و عوامل حدت مشابهی را در نظر گرفته اند به استثناء این مهم که اعضای EHEC توانایی تولید سمی مشابه سم شیگلا دیسانتریه (*Shiga like toxin*) را داشته، اما در برخی منابع دیگر مضاف بر این اختلاف، بیماریزایی آنها را بدلیل آدزین‌های متفاوت، فاکتورهای ترشحی و مکانیسم‌های تنظیمی این عوامل حدت با یکدیگر متفاوت می‌دانند (۲۸) . سویه‌های EPEC در گوساله‌ها حضور داشته و توانایی ایجاد بیماری در انسان و حیوانات را داشته و اینگونه بیان می‌شود که حیوانات و بخصوص نشخوارکنندگان حاملین خاموش سویه‌های EHEC بوده و پس از ایجاد عفونت در انسان، آنها سم مشابه سم شیگا را تولید نموده و علایم بالینی متفاوتی را در انسان ایجاد می‌نمایند و این امر را دلیل تفاوت بیماری‌زایی سویه‌های EPEC و EHEC در حیوانات و انسان می‌دانند (۲۰،۲۸).

اعضاء پاتوتیپ APEC برخلاف پاتوتیپ‌های روده‌ای *E. coli* عمدتا ایجاد کننده عفونت‌های تنفسی و سیستمیک در طیور بوده و بیماریزایی این سویه‌ها را بر پایه حضور و بیان عوامل حدتی از قبیل پادگن‌های سطحی CS31A و فیمبریه‌های P, F1, AC/I, Afa, F17 و اینتیمین، کلی سین V، هماگلوتینین حساس به حرارت (tsh)، سیستم‌های دخیل در اخذ آهن از محیط (fyu, irp, iuc, iutA)، عامل افزایش مقاومت سرمی (iss)، سم خود انتقالی ایجاد کننده واکوئل (vat) و سم مقاوم به حرارت تهاجمی به روده (ast) می‌دانند (۸،۱۴،۲۹،۳۳) و در مطالعه حاضر جدایه‌هایی که دارای عوامل خاص این پاتوتیپ بوده بعنوان APEC و بقیه بعنوان پاتوتیپ بیماریزای خارج روده‌ای (ExPEC) در نظر گرفته شده‌اند.

ژن‌های رمزکننده عوامل حدت در *E. coli* روی کروموزوم، پلاسمید و فاژها قرار داشته و می‌توانند براحتی از طریق انتقال افقی به سویه‌های غیر بیماریزا منتقل شوند و با توجه به این واقعیت که تعداد عوامل حدت شناسایی شده و دخیل در بیماریزایی این باکتری بصورت روزافزون افزایش یافته و شناسایی آنها توسط روش‌های مولکولی سنتی که توانایی ردیابی تعداد اندکی از این عوامل را در یک زمان دارند و به تبع آن تعیین ژنوتیپ و پاتوتیپ یک سویه توسط آنها مشکل بنظر رسیده، کارایی چندانی ندارند و از طرفی تکنیک ریزآرایه DNA که قادر است حداقل هزاران ژن را در یک زمان ردیابی نماید بعنوان ابزار مناسب و قدرتمندی در تعیین پاتوتیپ و ژن‌های حدت سویه‌های مختلف اشریشیا کلی کاربرد دارد. روش ریزآرایه DNA استفاده شده در این تحقیق که برای اولین بار در ایران روی جدایه‌های اشریشیا کلی مربوط به اسهال گوساله و طیور بومی ایران انجام پذیرفت، توانست بیش از ۲۶۰ ژن حدت مربوط به گونه اشریشیا کلی را غربالگری کرده و در هر نمونه حضور یا عدم حضور هر یک از این ژن‌ها را در نمونه‌ها تعیین نماید.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و دانشکده دامپزشکی بخاطر تامین اعتبار طرح تحقیقاتی شماره ۷۵۰۴۰۰۲/۶/۷ و همچنین از زحمات آقایان مهندس محمد مهدی غفاری و مهندس ایرج اشرافی تمای تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Anjum, M. F., Mafura, M., Slickers, P., Ballmer, K., Kuhnert, P., Woodward, M. J. et. al. (2007) Pathotyping *Escherichia coli* by Using Miniaturized DNA Microarrays. Appl. Environ. Microbiol. 73: 5692-5697.
2. Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschape, H. et. al. (1994) Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. Infect. Immunol. 62: 606-614.
3. Bruant, G., Maynard, C., Bekal, S., Gaucher, I., Masson, L., Brousseau, R. et. al.(2006) Development

www.SID.ir

Archive of SID

and validation of an oligonucleotide microarray for detection of multiple virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 72: 3780-3784.

4. Call, D. R., Bakko, M. K., Krug, M. J., Roberts, M. C. (2003) Identifying antimicrobial resistance genes with DNA microarrays. Antimicrob. Agents. Chemother. 47: 3290-3295.
5. Chizhikov, V., Rasooly, A., Chumakov, K., Lery, D. D. (2001) Microarray analysis of microbial virulence factors. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3258-3263.
6. Cho, J. C., Tiedje, J. M. (2001) Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3677-3682.
7. Clark, C. G., Johnson, S. T., Easy, R. H., Campbell, J. L., Rodgers, F. G. (2002) PCR for detection of cdt-II and the relative frequencies of cytolethal distending toxin variant-producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. J. Clin. Microbiol. 40: 2671-2674.
8. Dho-Moulin, M., Fairbrother, J. M. (1999) Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Vet. Res. 30: 299- 316.
9. Dobrindt, U., Agerer, F., Michaelis, K., Janka, A., Buchrieser, C., Samuelson, M. et. al. (2003) Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolated by use of DNA arrays. J. Bacteriol. 185: 1831-1840.
10. Ewers, C., Janbsen, T., Wieler, L. H. (2003) Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Berli Munch Tierarztl Wochenschr. 116:381-395.
11. Finlay, B. B., Falkow, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 136-169.
12. Fukushima, M., Kakinuma, K., Hayashi, H., Nagi, H., Ito, K., Kawaguchi, R. (2003) Detection and identification of Mycobacterium species isolates by DNA microarray. J. Clin. Microbiol. 41: 2605-2615.
13. Hacker, J., Blum, G., Mohldorfer, I., Tschape, H. (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Mol. Microbiol. 23: 1089-1097.
14. Jeffrey, J. S., Nolan, L. K., Tonooka, K. H., Wolfe, S., Giddings, C. W., Horne, S. M. et. al. (2002) Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or coliseptecemia lesions in chickens. Avian Dis. 46:48-52.
15. Johnson, J. R., Oswald, E., OBryan, T. T., Kuskowski, M. A., Spanjaard, L. (2002) Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates with neonatal bacterial meningitis in the Netherlands. J. Infect. Dis. 185: 774-784.
16. Korczak, B., frey, J., Schrenzel, J., Pluschke, G., Pfister, R., Ehricht, R. et. al. (2005) Use of diagnostic microarrays for determination of virulence gene patterns of *Escherichia coli* K1, a major cause of neonatal meningitis. J. Clin. Microbiol. 43: 1024-1031.
17. Korhonen, T. K., Valtonen, M. V., Parkkinen, J., Vaisanen-Rhen, V., Finne, J., Orskov, F. et. al. (1985) Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. Infect. Immun. 48: 486-491.
18. Mainil, J. G., Jacquemin, E., Herault, F., Oswald, E. (1997) Presence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-related sequences in necrotoxigenic *Escherichia coli* isolates from cattle: evidence for new variants of the AFA family. Can.J.Vet.Res. 61: 193-199.
19. Nagy, B., Fekete, P. Z. (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. IJMM. 295: 443-454.
20. Nataro, J. P., Kaper, J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11: 142-201.
21. Osek, J. (2003) Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene and its relationship with fimberial and enterotoxin markers in *E. coli* isolated from pigs with diarrhea. Vet. Microbiol. 91: 65-72.
22. Ott, M. (1993) Dynamics of bacterial genome-deletions and integrations as mechanisms of bacterial virulence modulation. Zbl. Bakteriol. Int. J. Med. Microbiol. 278: 457-468.

www.SID.ir

23. Palaniappan, R. U. M., Zhang, Y., Chiu, D., Torres, A., Debroy, C., Whittman, T. S. et. al. (2006) Differentiation of *Escherichia coli* Pathotypes by Oligonucleotide Spotted Array. J. Clin. Microbiol. 44: 1495-1501.
24. Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., carniel, E., Heesemann, J. (1998) Prevalence of the high pathogenicity island of Yersinia species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. Infect. Immunol. 66: 480-485.
25. Selander, R. K., Korhonen, T. K., Vaisanen-Rhen, R., Williams, P. H., Pattison, P. E., Caugant, D. A. (1986) Genetic relationships and clonal structure of strains of *Escherichia coli* causing neonatal septicemia and meningitis. Infect. Immun. 52: 213-222.
26. Sharme, V. K. (2002) Detection and quantitation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, O111 and O26 in beef and bovine feces by real-time polymerase chain reaction. J. Food Prot. 65: 1371-1380.
27. Smith, J. L., Fratamico, P. M., Gunther, N. W. (2007) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Foodborne Pathog. Dis. 4: 134-150.
28. Spears, K. J., Roe, A. J., Gally, D. L. (2006) A comparison of enteropathogenic *Escherichia coli* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. FEMS. Microbiol Lett. 255: 187-202.
29. Stordeur, P., Marlier, D., Blanco, J., Oswald, E., Biet, F., Dho-Moulin, M. et. al. (2002) Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesion genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. Vet. Microbiol. 84: 231-241.
30. Van Ijperen, C., Kuhnert, P., Frey, J., Cleweley, J. P. (2002) Virulence typing of *Escherichia coli* using microarrays. Mol. Cell. Probes. 16: 371-378.
31. Wang, H. Y., Malek, R. L., Kwitek, A. E., Greene, A. S., Luu, T. V., Behbahani, B. et. al. (2003) Assessing unmodified 70-mer oligonucleotide probe performance on glass-slide microarray. Genome. Biol. 4: 5.
32. Wing, G., Clark, C. G., Rodgers, F.G.(2002) Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 40: 3613-3619.
33. Won, G., Moon, B., Oh, I., Matsuda, K., Chaudhari, A. A., Hur, J. et. al. (2009) Profiles of Virulence-associated Genes of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from chickens with colibacillosis. JPSA. 46:260-263.
34. Wu, C. F., Valdes, J. J., Bentley, W. E., Sekowski, J. W. (2003) DNA microarray for discrimination between pathogenic O157:H7 EDL933 and non-pathogenic *Escherichia coli* strains. Biosens. Bioelectron. 19: 1-8.
35. Wu, L., Thompson, D. K., Li, G., Hurt, R. A., Tiedje, J. M., Zhou, J. (2001) Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5780-5790.

Archive of SID

Pathotyping of isolated *Escherichia coli* from domesticated calves and poultry using modern DNA microarray technique

Staji, H.[1], Zahraei Salehi, T.[2*], Mehdizade Dastjerdi, A.[3], Tonelli, A.[4]

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan- Iran.*

[2]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.*

[3]*Department of Virology, VLA Institute, Weybridge, England.*

[4]*Department of Biotechnology, IZS Institute, Teramo, Italy.*

(Received 15 May 2011 , Accepted 24 July 2011)

Abstract:

BACKGROUNDS: Detection of virulence factors harbored in *Escherichia coli* strains is important to determine a genotyping profile, and the pathotype of an *Escherichia coli* isolate. **OBJECTIVES:** The objective of this study was to determine the pathotype of *E. coli* strains isolated from calves and poultry domesticated in Iran by using DNA microarray technology. **METHODS:** In this study, 67 strains of isolated *E. coli* from calves and poultry (51 from calves and 16 from poultry respectively) were monitored for the presence of different virulence factors. The pathotype of each strain was made using DNA Microarray technology. The array used 109 probes for the common virulence genes of *Escherichia coli* and 154 probes for virulence genes that were specifically included pathotypes. **RESULTS:** Results showed that *Escherichia coli* strains from calves were 47% EHEC, 15.68% EPEC, 15.68% UPEC, 1.96% ETEC, 1.96% a combination of EPEC and UPEC, and 17.64% of strains non-specific to any of the pathotypes. In the samples from poultry, 62.5% of strains were pathotyped as APEC, 31.25% ExPEC, and 6.25% non- specific to any pathotype. **CONCLUSIONS:** This study revealed that DNA Microarray, as compared with other traditional molecular techniques, is a powerful tool for demonstration of the genotyping profile and pathotype of *Escherichia coli* strains.

Key words: *Escherichia coli*, virulence factors, pathotype, DNA Microarray.

***Corresponding author's email: tsalehi@ut.ac.ir, Tel: 021-66427517, Fax: 021-61117052**

www.SID.ir