Arch
Original Article
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۸، دوره ۷۴، شماره ۱، ۱۵۲-۱۴۳
مقاله تحقیقی
DOI: 10.22059/jvr.2017.234300.2635

# بررسی حضور و مقایسه فراوانی *iss* و *bor*، به عنوان دو ژن مؤثر در مقاومت سرمی، در اشریشیا کلی جدا شده از شترمرغ‌های به ظاهر سالم با اشریشیا کلی جدا شده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز

**افسانه حسینی[۱]، سعید سالاری[۲]، احمد راشکی[۲]، محمد جهانتیغ[۳]**

[۱]دانش آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، سیستان و بلوچستان، ایران
[۲]گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، سیستان و بلوچستان، ایران
[۳]گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، سیستان و بلوچستان، ایران

(دریافت مقاله: ۳۱ اردیبهشت ماه ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۲۵ شهریور ماه ۱۳۹۷)

## چکیده

**زمینه مطالعه:** مکانیسم پاتوژنز و نقش فاکتورهای حدت اشریشیاکلی بیماریزای طیور هنوز مبهم است. همان‌طور که صنعت تکثیر و پرورش شترمرغ رو به رشد است، ارتباط بین شترمرغ و طیور اهلی نیز احتمالاً رو به افزایش می‌باشد. گزارشاتی وجود دارد مفید بودن مطالعه همزمان دو ژن حدت *iss* و *bor* به علت شباهت ساختمانی و عملکردی آن‌ها را در اشریشیاکلی نشان داده است.

**هدف:** بررسی حضور و مقایسه فراوانی دو ژن مؤثر در مقاومت سرمی در اشریشیا کلی جداشده از شترمرغ‌های به‌ظاهر سالم با اشریشیا کلی جداشده از مدفوع طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز.

**روش کار:** مطالعه مقطعی-توصیفی است. حضور ژن‌های *iss* و *bor* توسط PCR در اشریشیا کلی جدا شده از نمونه مدفوع شترمرغ‌های به‌ظاهر سالم و مدفوع طیور مبتلا به کلی باسیلوز بررسی و مقایسه شد.

**نتایج:** فراوانی ژن *iss* در اشریشیا کلی جداشده از مدفوع شترمرغ‌های به ظاهر سالم (۵۰درصد)، بدون تفاوت معنی‌دار، کمتر از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز (۶۴/۴درصد) بود ($P<0/05$). فراوانی ژن *bor*، بدون تفاوت معنی‌دار، در اشریشیا کلی جداشده از مدفوع شترمرغ‌های به ظاهر سالم (۳۱/۸درصد) بیشتر از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز (۱۵/۶درصد) مشاهده گردید ($P<0/05$). فراوانی جدایه‌های اشریشیاکلی حاوی هر دو ژن در مدفوع شترمرغ و طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز، بدون تفاوت معنی‌دار، به ترتیب ۱۸/۲درصد و ۱۱/۱درصد حاصل شد ($P<0/05$).

**نتیجه‌گیری نهایی:** توزیع آماری دو ژن *iss* و *bor* در مدفوع شترمرغ‌های به‌ظاهر سالم و طیور مبتلا به کلی-باسیلوز یکسان بوده و با توجه به سالم بودن شترمرغ‌های مورد مطالعه، احتمالاً مکانیزم‌های بیماریزایی باکتری در شترمرغ با طیور متفاوت و این جدایه‌ها، عواملی، غیر از ژن‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر را برای ایجاد بیماری در شترمرغ به کار می‌گیرند که این مطلب نیاز به بررسی ژن‌های حدت بیشتری در این جدایه‌ها دارد. به‌علاوه، می‌توان مدفوع شترمرغ را به عنوان منبعی برای جابجایی ژن *iss* و *bor* بین طیور در نظر گرفت.

**واژه‌های کلیدی:** اشریشیا کلی، *bor*، *iss*، شترمرغ و کلی‌باسیلوز

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله تحقیقات دامپزشکی محفوظ است.

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۵۴۲-۴۸۲۲۲۷۸ نمابر: ۰۵۴۲-۴۸۲۲۲۵۱ Email: saeedsalari@uoz.ac.ir

**How to Cite This Article**

Hosseini, A., Salari, S., Rashki, A., Jahantigh, M. (2019). Presence of Two Genes Involved in Serum Resistance of *Escherichia coli* Isolated From Healthy Ostriches in Comparison With Infected Poultry by Colibacillosis. J Vet Res, 74(1), 143-152. doi: 10.22059/jvr.2017.234300.2635

www.SID.ir

Archive of SID

## مقدمه

کلی‌باسیلوز (Colibacillosis) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی گله‌های طیور صنعتی در ایران و جهان می‌باشد (۲۵) و در بین بیماری‌های متعدد طیور که احتمالاً قابل‌انتقال به انسان هستند یکی از نخستین نگرانی‌ها می‌باشد (۲۸). از نتایج مهم این بیماری، واگیری و تلفات بالا و صدمات اقتصادی قابل‌توجهی است که سالیانه به صنعت طیور ایران تحمیل می‌کند (۹،۱۱،۱۶،۲۴،۲۹،۳۰،۳۸،۴۰).

علت اصلی کلی‌باسیلوز طیور، اشریشیا کلی بیماریزای طیور (Avian Pathogenic *Escherichia coli*, APEC) است (۲۵). در سال‌های اخیر، اطلاعات مفیدی در مورد عوامل حدت APEC و نیز مکانیسم‌های توسعه عفونت بکارگرفته شده توسط این باکتری و نیز ایجاد بیماری، با استفاده از روش‌های دقیق مولکولی حاصل شده‌است، اما علی‌رغم تلاش محققین، هنوز مکانیسم APEC و مکانیسم پاتوژنز و نقش فاکتورهای حدت آن مبهم است (۸،۳۰،۳۱،۳۲). درنتیجه کنترل کلی‌باسیلوز در اثر کمبود این اطلاعات مختل شده است (۳۲). ارزیابی دقیق خسارات اقتصادی مرتبط با اشکال مختلف عفونت‌های اشریشیا کلی مشکل است چرا که تفاوت در حدت جدایه‌های مختلف اشریشیا کلی و تعامل آن با پاتوژن‌های دیگر و عوامل استرس‌زای محیطی در این میان تأثیرگذار است (۲۵).

تکثیر و پرورش شترمرغ (*Struthio camelus*) در مصر، در اواخرقرن نهم، به دلیل شرایط آب‌وهوایی ایده‌آل آن گسترده شد (۱۵). زمانی که ایران واردات شترمرغ را آغاز کرد، صنعت پرورش شترمرغ، به طور قابل ملاحظه‌ای در ایران گسترش یافت (۳۷). از طرفی، نگرانی‌هایی درباره وضعیت سلامت پرندگان وارداتی وجود دارد. خصوصاً در رابطه با امکان این که این پرندگان بتوانند به عنوان مخازن ویروس‌ها و باکتری‌های نوظهور نقش بازی کنند (۴۳). همان طور که جمعیت شترمرغ رو به رشد است، ارتباط بین شترمرغ‌ها و طیور اهلی احتمالاً رو به افزایش است. اثر این وضعیت روی صنعت مرغداری، پنهان باقی مانده است (۱۴،۲۶). علی‌رغم اهمیّت اشریشیا کلی به عنوان بیماریزای طیور، مکانیسم‌های حدت پایه بکار گرفته شده توسط اشریشیا کلی برای ایجاد بیماری در پرندگان بویژه شترمرغ پنهان باقی مانده و ویژگی باکتریایی منحصر به فردی که به عنوان نشانی برای ایزوله‌های دارای حدت باشد، شناخته نشده است (۲۶). Tobias و همکاران در سال ۲۰۱۲ بررسی‌هایی روی شترمرغ انجام دادند و بیان کردند که بیماری‌هایی که بوسیله اشریشیا کلی ایجاد می‌شوند به عنوان خسارات مهمی برای انسان و حیوانات مطرح هستند (۴۲). با توجه به گسترش مزارع پرورش شترمرغ در کشور و توجّه فراوان مسئولین و نیز دامپروران با این جنبه نوین صنعت دامپروری، آگاهی از شیوه صحیح نگه‌داری این حیوان، پیش‌گیری از بیماری‌های آن و نیز در صورت امکان روش‌های مؤثر درمان این بیماری‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. لازم به ذکر است به علت جوان بودن این صنعت اطلاعات زیادی درخصوص نحوه نگهداری و پرورش آن نیز در دسترس نمی‌باشد درحالی‌که بایستی این صنعت را از جهات بسیاری مانند پرورش و تولید و جنبه‌های ژنتیکی و اصلاح نژادی، رفتارشناسی، تجهیزات موردنیاز و موارد دیگری مورد بررسی قرار داد و کمبودهای آن را توسط تحقیقات علمی انجام گرفته، برطرف نمود تا بدین ترتیب شاهد برطرف شدن مشکلات موجود و ارائه تکنیک‌های پرورشی کارآمد بوده تا بتوان به دنبال آن به بیش‌ترین میزان برگشت سرمایه و کم‌ترین ریسک سرمایه‌گذاری دست یافت (۲۶،۳۵،۳۶،۴۱). از آن‌جا که عوامل بیماریزای طیور صنعتی و شترمرغ‌سانان با هم مشابهند، احتمالاً همان قوانین بهداشتی و کنترلی مورداستفاده در مزارع پرورش طیور صنعتی و بوقلمون‌ها برای این پرنده‌ها نیز می‌تواند تا حدودی صادق باشد (۳۲،۳۶).

مقاومت سرمی در بسیاری از انواع میکروارگانیسم‌های پاتوژن مهم است و یکی از بارزش‌ترین فاکتورهای حدت باکتریایی جهت مطالعه بویژه در بیماری کلی باسیلوز طیور محسوب می‌شود (۲۲) به علت این که شکل بروز کلی-باسیلوز طیور اکثراً سپتی‌سمی است و این فاکتور حدت، نقش مهمی در پاتوژنز این بیماری دارد (۳۹).

ژن *bor* (blue open reading frame gene) با ژن افزایش‌دهنده بقای سرمی یا *iss* (increased serum survival gene) که در شرایط آزمایشگاهی، مقاومت باکتریایی به کمپلمان سرم را افزایش می‌دهد، شباهت زیادی دارد (۴). محصولات این دو ژن حدت، دارای شباهت ساختاری و عملکردی می‌باشند. (۲۲). ژن *bor* تنها ژن فاژی است که روی حساسیت سرمی میزبان لیزوژنی مؤثر است و توالی آن در تعداد زیادی از سویه‌های اشریشیا کلی یافت شود (۳). فعالیت ژن *bor* به عنوان اولین مثالی شناخته می‌شود که عملکرد یک فاژ را به طور مستقیم در مقاومت به ایمنی به عهده دارد (۲۷). ژن *iss* برای اولین بار توسط Binns و همکاران در سال ۱۹۷۹ توصیف گردید (۶) و در پلاسمید ColV در اشریشیا کلی به صورت محافظت‌شده قرار دارد (۱۹). به نظر میرسد مطالعه همزمان این دو ژن به علت شباهت بالای ساختمانی و عملکردی مفید باشد (۳۹). از طرفی، کنترل بیماری‌های باکتریایی، بدون آگاهی در زمینه عوامل حدت و روش‌های بیماریزایی باکتری به سادگی قابل دسترس نخواهد بود و در این تحقیق سعی شده است که با تعیین فراوانی و مقایسه فراوانی دو ژن حدت، به نزدیک شدن به این موضوع، در منطقه مورد مطالعه، کمک شود.

هدف از مطالعه حاضر بررسی حضور و مقایسه فراوانی *iss* و *bor*، به عنوان دو ژن مؤثر در مقاومت سرمی، در اشریشیاکلی جداشده از شترمرغ‌های به‌ظاهر سالم با اشریشیا کلی جداشده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز در منطقه بیرجند است.

## مواد و روش کار

**جامعه آماری و روش نمونه‌گیری:** نمونه‌گیری به روش تصادفی ساده از

www.SID.ir

Archive of SID


مزارع مختلف شترمرغ و مرغداری‌های منطقه بیرجند از اردیبهشت ۱۳۹۴ تا شهریور ۱۳۹۴ انجام شد. تعداد ۵۹ نمونه‌ی مدفوع از شترمرغ‌های به ظاهر سالم و ۵۴ نمونه مدفوع از طیور تلف شده از بیماری کلی‌باسیلوز از منطقه بیرجند به روش نمونه برداری مستقیم از رکتوم جمع‌آوری شد و سپس در کمترین زمان در کنار یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل انتقال و در فریزر ° ۸۰- تا شروع کار آزمایشگاهی ذخیره شد.

**جداسازی اشریشیاکلی از مدفوع:** پس از کدگذاری، نمونه‌ها در دمای اتاق یخ‌زدایی شدند و سپس هر نمونه با سوآب هموژنیزه و به صورت خطی در محیط مک کانکی کشت داده شد. سپس پرگنه‌های قرمز رنگ به محیط ائوزین متیلین بلو آگار منتقل شدند و جهت تکثیر به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری گردید (۴۵).

**تایید هویت باکتری براساس آزمون‌های بیوشیمیایی:** جهت تفریق باکتری اشرشیاکلی از سایر باکتری‌هایی که در محیط ائوزین متیلن بلو و مک کانکی آگار رشد کرده بودند، پرگنه‌های تک این دو محیط مورد آزمون‌های بیوشیمیایی قرار گرفتند. به این ترتیب که در محیط آگار سه قندی آهن‌دار، محیط آگار سیترات، محیط اوره براث کشت داده شدند و آزمون‌های حرکت، ایندول و متیل رد و وگس پروسکائر انجام شد. برای بدست آمدن پرگنه خالص، یک پرگنه دوباره بر روی محیط ائوزین متیلین بلو آگار کشت داده شد (۴۵).

**بررسی حضور ژن *iss* و *bor* توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در اشریشیاکلی جداشده از مدفوع شتر مرغ‌های به ظاهر سالم و طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز (مواد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن *iss* و *bor*):** مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ به تفسیر ذکر شده است. استخراج DNA به روش جوشاندن انجام شد (۱۲). مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به میزان ۲۵ µl، شامل ۱۲/۵ µl مخلوط مادر(شرکت پیشگام، ایران)، ۱ µl از هر کدام از آغازگرهای *iss* Forward و *iss* Reverse (شرکت سیناکلون، ایران)، ۷/۵ µl آب مقطر دیونیزه و ۳ µl از DNA استخراج شده، برای جستجوی ژن *iss* تهیه شد. به منظور ردیابی حضور ژن *bor* در جدایه‌ها، از آغازگرهای *bor* Forward و *bor* Reverse (شرکت سیناکلون، ایران) استفاده شد. در ابتدا مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن *bor* به میزان ۲۵ µl تهیه شد که شامل ۱۲/۵ µl از مخلوط مادر (شرکت پیشگام، ایران)، ۱ µl از آغازگر *bor* Forward و ۱ µl از آغازگر *bor* Reverse، ۸/۵ µl آب مقطر دیونیزه و ۲ µl از DNA استخراج شده بود.

**برنامه مورد استفاده در دستگاه ترموسایکلر برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن *iss* و *bor*:** از دستگاه ترموسایکلر اپندروف (Programmable gradient Eppendorf's Master cycler® pro, Eppendorf, Hamburg, Germany) برای افزوده سازی DNA استفاده شد. مراحل برنامه مورد استفاده برای ژن *iss* عبارت بود از سه مرحله: مرحله اول شامل چهار دقیقه واسرشتگی اولیه در ۹۴ °C، مرحله دوم شامل ۳۵ چرخه و هر چرخه شامل سه گام: گام اول، دناتوراسیون ۴۵ ثانیه در ۹۴ °C، گام دوم شامل اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه در ۵۴ °C، گام سوم شامل طویل‌شدن قطعات سه دقیقه در ۶۸ °C و مرحله سوم بسط و گسترش نهایی که به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ °C انجام شد.

برای ژن *bor*، سه مرحله برنامه شامل واسرشتگی اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹۵ °C، مرحله دوم شامل ۳۰ چرخه و هر چرخه شامل دناتوراسیون ۴۵ ثانیه در ۹۵ °C، اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه در ۶۲/۲ °C و طویل‌شدن قطعات ۴۵ ثانیه در ۷۲ °C، و مرحله سوم بسط و گسترش نهایی که به مدت هفت دقیقه در ۷۳ °C انجام شد.

**الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن‌های *iss* و *bor*:** ژل آگارز یک درصد در بافر ۰/۵x TBE تحت ۸۰ ولت به مدت یک ساعت و ۳۰ دقیقه برای تعیین کمیت و کیفیت تکثیر ژن‌های مورد مطالعه استفاده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه عکس برداری از ژل (Gel Documentation System, New Delhi, India) مشاهده گردید.

**روش تجزیه و تحلیل آماری:** داده‌ها با نرم افزار SPSS و آزمون مربع کای، تجزیه و تحلیل شد. مقدار معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

## نتایج

**نتایج جداسازی فنوتیپی اشریشیاکلی:** در این تحقیق تعداد ۱۱۳ نمونه شامل ۵۹ نمونه مدفوع از شترمرغ‌های به ظاهر سالم و ۵۴ نمونه مدفوع از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز جمع‌آوری گردید. از ۵۹ نمونه مدفوع طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز، تعداد ۴۵ جدایه (۸۳/۳ درصد) و از ۵۹ نمونه مدفوع از شترمرغ‌های به ظاهر سالم، ۴۴ جدایه (۷۴/۶ درصد) دارای اشریشیاکلی بودند. این نمونه‌ها از نظر حضور ژن‌های *iss* و *bor* از طریق PCR مورد مطالعه قرار گرفتند (تصاویر ۱،۲).

**فراوانی ژن‌های *iss* و *bor* در اشریشیاکلی جداشده از شترمرغ‌های به ظاهر سالم:** طبق جدول ۲، ۵۰ درصد از اشریشیاکلی جداشده از شترمرغ‌های به ظاهر سالم دارای ژن *iss* بودند. فراوانی ژن *bor* نیز در اشریشیاکلی جداشده از شترمرغ‌های به ظاهر سالم ۳۱/۸ درصد بود. ۱۸/۲ درصد این نمونه‌ها حاوی هر دو ژن بودند. آنالیز آماری تفاوت معنی‌داری بین فراوانی دو ژن حدت در جدایه‌های شترمرغ‌های به ظاهر سالم نشان نداد ($P>0/05$).

**فراوانی ژن‌های *iss* و *bor* در اشریشیاکلی جداشده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز:** فراوانی ژن *iss* در اشریشیاکلی جداشده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز ۶۴/۴ درصد بدست آمد (جدول ۲). فراوانی ژن *bor* در اشریشیاکلی جداشده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز ۱۵/۶ درصد بود. در این بررسی ۱۱/۱ درصد نمونه‌های اشریشیاکلی جداشده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز حاوی هر دو ژن بودند. آنالیز آماری نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین فراوانی دو ژن حدت در جدایه‌های طیور کلی‌باسیلوزی بود

www.SID.ir

Archive of SID

**جدول ۱.** آغازگرهای مورد استفاده برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن‌های *bor* و *iss*.

| منبع | اندازه (bp) | توالی (۵'-۳') | نام آغازگر |
|---|---|---|---|
| (۴۰) | ۶۵۸ | CTCGATGCAAAATTACACGAAGGAGTTAGCT | *bor*Forward |
| | | TAATTTTCTACACATACHATTCTGCGAACT | *bor*Reverse |
| (۱۰) | ۳۰۹ | ATCACATAGGATTCTGCCG | *iss*Forward |
| | | CAGCGGAGTATAGATGCCA | *iss* Reverse |

**جدول ۲.** فراوانی ژن‌های حدت در جدایه‌های اشریشیاکلی طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز و شترمرغ‌های به ظاهر سالم. ×: دارای تفاوت آماری.

| | تعداد جدایه دارای ژن *iss* (درصد) | تعداد جدایه دارای ژن *bor* (درصد) | تعداد جدایه دارای ژن‌های *iss* و *bor* (درصد) |
|---|---|---|---|
| طیور مبتلا به کلی باسیلوز | ۲۹ (۶۴/۴)× | ۷ (۱۵/۶) × | ۵ (۱۱/۱) |
| شترمرغ به ظاهر سالم | ۲۲ (۵۰) | ۱۴ (۳۱/۸) | ۸ (۱۸/۲) |

($P<۰/۰۵$).

**مقایسه فراوانی ژن‌های *iss* و *bor* در اشریشیاکلی جداشده از شترمرغ‌های به ظاهر سالم با اشریشیاکلی جداشده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز:** با توجه به جدول ۲، فراوانی ژن *iss* در جدایه‌های شترمرغ‌های به ظاهر سالم کم‌تر از جدایه‌های طیور مبتلا به کلی باسیلوز می‌باشد که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($P>۰/۰۵$). از طرفی فراوانی ژن *bor* در جدایه‌های شترمرغ‌های به ظاهر سالم بیش‌تر از جدایه‌های طیور کلی‌باسیلوزی است. اگر چه باز هم آنالیز آماری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P>۰/۰۵$).

نتایج نشان داد که فراوانی حضور هم‌زمان هر دو ژن مؤثر در حدت در جدایه‌های شترمرغ‌های به ظاهر سالم به طور میانگین به میزان ۱۸/۲ درصد و در جدایه‌های طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز برابر با ۱۱/۱درصد می‌باشد که با انجام آزمون آماری مشاهده شد که جدایه‌های شترمرغ‌های به ظاهر سالم بیشتر از جدایه‌های طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز حامل هر دو ژن می‌باشند. اگر چه نتایج نشان دهنده بیشتر بودن فراوانی هم‌زمان دو ژن در جدایه‌های شترمرغ‌های به ظاهر سالم از موارد کلی‌باسیلوزی می‌باشد، اما بین این دو تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲).

## بحث

در تحقیق حاضر حضور دو ژن حدت مقاومت به کمپلمان، ژن‌های *iss* و *bor*، در منطقه بیرجند در اشریشیاکلی جداشده از شترمرغ‌های به ظاهر سالم و اشریشیاکلی جداشده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز مورد بررسی و فراوانی این دو ژن در نمونه‌های شترمرغ‌های به ظاهر سالم و طیور کلی‌باسیلوزی مورد مقایسه قرار گرفت.

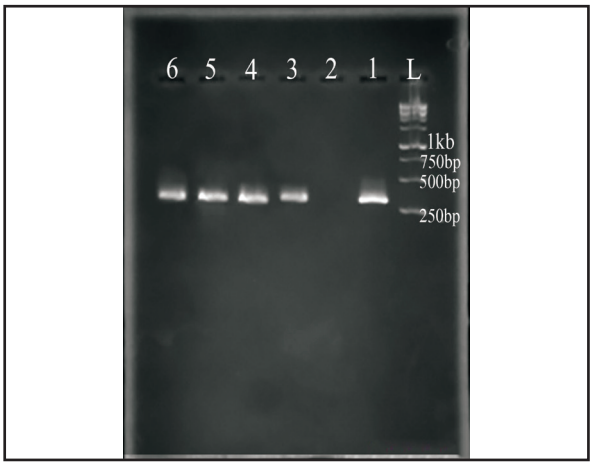
کنترل کلی‌باسیلوز در ابتدا نیازمند آگاهی کامل از چگونگی تهاجم باکتری و شناسایی ژن‌های حدت می‌باشد (۲۱) که این موضوع در مطالعه حاضر مورد توجه قرار گرفته تا با شناسایی و تعیین فراوانی دو ژن حدت که در مقاومت سرمی عامل کلی‌باسیلوز نقش دارند، علاوه بر افزایش دانسته‌ها در مورد اشریشیاکلی جدا شده از شترمرغ، گامی در زمینه کمک به کنترل کلی‌باسیلوز طیور در منطقه مورد مطالعه برداشته شود.

مقاومت به سرم یکی از مهم‌ترین عوامل دخیل در حدت APEC است (۳۴). ژن افزایش‌دهنده بقای سرمی که در مقاومت سرمی اشریشیاکلی دخالت دارد (۶) به میزان معنی‌داری در اشریشیاکلی بیماریزای طیور بیش‌تر از اشریشیاکلی جدا شده از طیور سالم وجود دارد (۳۸).

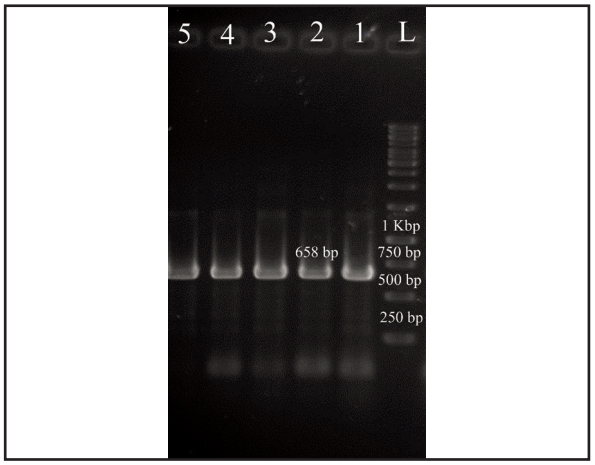
نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فراوانی ژن *iss* در شترمرغ‌های به ظاهر سالم و طیور کلی‌باسیلوزی در منطقه بیرجند، به ترتیب، ۵۰ و ۶۴/۴ درصد می‌باشد که تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد. نتیجه تحقیق حاضر، به عنوان اولین گزارش فراوانی ژن‌های حدت دخیل در مقاومت سرمی در جدایه‌های اشریشیاکلی شترمرغ‌های بالغ قابل احتساب است. در اولین گزارش از فراوانی ژن *iss* در ایران، فراوانی این ژن در طیور به ظاهر سالم ۱۷ درصد و در طیور بیمار ۸۷ درصدگزارش شد (۹) که دارای اختلاف معنی‌داری بود. در تحقیق Delicato و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند که ژن حدت *iss*، بیش‌تر در نمونه‌های کلی‌باسیلوزی نسبت به ایزوله‌های مدفوعی از پرندگان سالم وجود دارد (۷)، در حالی که در تحقیق حاضر تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های شترمرغ‌های به ظاهر سالم و طیور کلی‌باسیلوزی مشاهده نشد. موارد فوق تاییدکننده این موضوع می‌باشد که عوامل بیماریزا تأثیر کم‌تری روی شترمرغ دارد یا این که عوامل حدت دیگری در بیماریزایی باکتری نقش دارند و یا احتمالاً فراوانی ژن *iss* در گونه‌های مختلف پرندگان متفاوت است. هرچند که گزارش بیماری‌ها در شترمرغ رو به افزایش است، با این حال مقاومت شترمرغ به بیماری بیش‌تر از سایرین می‌باشد. با گسترش صنعت شترمرغ، اهمیت کنترل بیماری‌ها در این صنعت افزایش می‌یابد و احتمالاً عوامل بیماریزا درگیری‌های بیش‌تری در این صنعت ایجاد کنند. میزان بیماریزایی باکتری در شترمرغ بسته به شرایط محیطی آن است. از طرفی در یک شترمرغ سالم که تحت استرس نباشد، لنفوسیت‌ها و سایر گلبول‌های سفیدمانع از انتقال باکتری‌های موجود در روده از طریق جریان لنف به سیستم عمومی گردش خون بدن می‌شوند. در نتیجه احتمالاً درحضور درصد قابل توجهی از ژن *iss*، بیماری تظاهرات بالینی نشان نمی‌دهد، درحالی که همین درصد، در طیور، باعث بروز بالینی

www.SID.ir

Archive of SID


**تصویر ۱.** الکتروفورز محصول PCR ژن *iss* با اندازه باند ۳۰۹ bp بر روی ژل آگارز یک درصد. L : مارکر ۲۵۰ جفت‌بازی. چاهک ۱: کنترل مثبت (χ۱۳۷۸). چاهک ۲: کنترل منفی. چاهک‌های ۳ و ۴: نمونه‌های مدفوع شترمرغ و چاهک‌های ۵ و ۶: نمونه‌های مدفوع طیور کلی‌باسیلوزی.




**تصویر ۲.** الکتروفورز محصول PCR ژن *bor* با اندازه باند bp۶۵۸ بر روی ژل آگارز یک درصد. L : مارکر ۲۵۰ جفت‌بازی. چاهک ۱: کنترل مثبت (χ۱۳۷۸). چاهک‌های ۲ و ۳: نمونه‌های مدفوع شترمرغ و چاهک‌های ۴ و ۵: نمونه‌های مدفوع طیور کلی‌باسیلوزی.

بیماری کلی‌باسیلوز شده است که این فرضیه نیازمند تحقیق بیشتری در شترمرغ‌های بیمار و مبتلا به کلی باسیلوز می‌باشد. تأثیر شترمرغ روی صنعت طیور تاکنون پنهان باقی مانده است ولی این نکته باید مدنظر باشد که با توجه به نتایج مطالعه حاضر انتقال آلودگی از شترمرغ به طیور می‌تواند تلفات سنگینی را ایجاد کند (۵).

ژن *iss* یکی از ژن‌های حدتی است که به طور مشخص در پاتوژنز بیماری حاصل از اشرشیا کلی دارای نقش است (۴۶). Abd El Tawab و همکاران در سال ۲۰۱۴ تحقیقی در مورد ویژگی‌های مولکولی و فنوتیپی تعداد ۱۵۳ اشریشیا کلی بیماریزای طیور، ۳۰ اشریشیا کلی مدفوعی طیور و ۳۶ اشریشیا کلی محیطی انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که ۹۰ درصد همه اشریشیا کلی‌های بیماریزای طیور، ژن *iss* را به عنوان یکی از ژن‌های حدت داشتند (۱).

ژن *iss* در سروتیپ‌هایی از نواحی جغرافیایی مختلف یافت شده است (۹). در اکثر مطالعات انجام شده در نقاط مختلف دنیا فراوانی *iss* در طیور کلی‌باسیلوزی در حدود ۸۲-۷۲ درصد در موارد APEC گزارش شده است (۴۴) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. در بررسی Kafshdouzan و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی اشریشیا کلی جدا شده از کلی‌باسیلوز طیور، فراوانی ژن *iss*، ۶۸/۲ درصد بدست آمد (۲۴). Wen-jie و همکاران در سال ۲۰۰۸ در بررسی ۲۱۶ جدایه اشریشیا کلی بیماریزای طیور در طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز را در نقاط مختلف چین فراوانی ژن *iss* را ۵۸/۸ درصد بدست آوردند (۴۴). در بررسی Jeong و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی ژن‌های حدت ۱۰۱ سویه اشریشیا کلی بیماریزای طیور جداشده از طیور عفونی، فراوانی ژن *iss* ۷۸/۲ درصد بود (۱۷).

با توجه به فراوانی نسبتاً بالای ژن *iss* در طیور کلی‌باسیلوزی، می‌توان این ژن را به عنوان عاملی جهت شناسایی بیماری کلی‌باسیلوز در منطقه مورد مطالعه در تحقیق حاضر در نظر گرفت (۳۳). با توجه به مطالعات مختلف در نقاط مختلف دنیا، فراوانی *iss* دارای حداقل میزان ۴۱/۵ در سال ۲۰۰۹ و حداکثر میزان ۹۶/۴ در سال ۲۰۱۳ می‌باشد (۲).

ژن *bor* اولین بار توسط Barondess و Beckwith در سال ۱۹۹۰ کشف شد که مشخصاً بقای سلول میزبان اشریشیا کلی در سرم حیوان را افزایش می‌دهد (۳،۴). این ویژگی به خوبی به عنوان مشخصه بیماریزایی باکتری شناخته شده است (۳،۴،۲۳). تاکنون هیچ مطالعه‌ای در ارتباط با بررسی حضور و فراوانی ژن‌های *bor* و *iss* در شترمرغ و مقایسه آن با اشریشیا کلی جداشده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز در ایران صورت نگرفته است. لذا براساس بررسی منابع موجود، این تحقیق به عنوان اولین گزارش ژن *bor* در شترمرغ بالغ در ایران محسوب می‌شود. نتایج تحقیق حاضر، فراوانی نسبتاً بالایی از ژن *bor* در شترمرغ‌های به ظاهر سالم و طیور کلی‌باسیلوزی را نشان داد. تحقیقات نشان داده‌اند که ژن افزایش‌دهنده بقای سرمی یا *iss* (۶) نقش مهم‌تری در ایجاد مقاومت به کمپلمان نسبت به ژن *bor* دارد (۴۶).

در مطالعه حاضر، میزان فراوانی ژن *bor* در اشریشیا کلی جداشده از شترمرغ‌های به ظاهر سالم ۳۱/۸ درصد و در اشریشیا کلی جداشده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز ۱۵/۶ درصد بود. با توجه به فراوانی آماری یکسان ژن *bor* در شترمرغ و اشریشیا کلی جداشده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز به نظر می‌رسد می‌توان شترمرغ را به عنوان منبعی برای جابجایی این ژن بین طیور در نظر گرفت. به نظر می‌رسد برای تشخیص بیماری کلی‌باسیلوز در شترمرغ نسبت به طیور کلی‌باسیلوزی، ژن *bor* در کنار ژن *iss* کارایی زیادی در منطقه مورد مطالعه نخواهد داشت، زیرا بین طیور بیمار و شترمرغ سالم تفاوت معنی‌داری از نظر فراوانی دو ژن مشاهده نگردید. با تشخیص سریع‌تر بیماری در طیور و به خصوص در شترمرغ، هزینه‌های درمان کاهش یافته، از طرفی بیماری به سرعت تحت کنترل قرار می‌گیرد. در نتیجه تولید افزایش می‌یابد و ضررهای اقتصادی بیماری حاصل از اشریشیا کلی

www.SID.ir

Archive of SID

وارد سیر نزولی خواهد شد. باتوجه به تأثیر روی سلامت عمومی و به دلیل احتمال انتقال ژن‌های حدت از شترمرغ به طیور اهمیت بررسی فاکتورهای حدت در شترمرغ دوچندان می‌شود (۱۳،۱۴).

فراوانی ژن‌های حدت در \شریشیا کلی بیماریزای طیور براساس مکان جغرافیایی و میزبان متفاوت است (۱۰). همچنین، مطالعات بسیاری پیشنهاد کرده‌انـد که تعیین و تخمین توزیع پاتوتیـپ انواع باکتری‌های بیماریزا در مناطق جغرافیایی و میزبان‌های مختلف، از جمله \شریشیا کلی بیماریزای طیور در سطح مولکولی می‌تواند به عنوان رهیافتی برای کنترل کلی باسیلوز در نظر گرفته شود. این هدف با تعیین فراوانی همزمان ژن‌های حدت قابل انجام است (۲۰، ۱۸). به علت شباهت ساختمانی و عملکردی دو ژن حدت *bor* و *iss* و این نکته که هر دو حفاظت شـده‌اند، مطالعه همزمان این دو در مطالعه APEC و کنترل کلی‌باسیلوز طیور بسیار حائز اهمیت است (۳۱). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که فراوانی حضور همزمان هر دو ژن مؤثر در حدت در جدایه‌های شـترمرغ‌های به ظاهر سالم به طور میانگین به میزان ۱۸/۲ درصد و در جدایه‌های طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز برابر با ۱۱/۱درصد می‌باشد که اگر چه نتایج، نشان دهنده بیشتر بودن فراوانی همزمان دو ژن در جدایه‌های شترمرغ‌های به ظاهر سالم از موارد کلی‌باسیلوزی می‌باشد، اما بین این دو تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. مطالعاتی در این زمینه، بویژه در مورد شترمرغ، براساس بررسی منابع موجود، یافت نشد تا نتایج مطالعه حاضر در منطقه با سـایر مناطق ایران مقایسـه شـود. Kafshdouzan و همکاران در سـال ۲۰۱۲ در بررسـی توزیع ژن‌هـای مرتبط با حدت در \شریشیا کلی جداشده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز به این نتیجه رسیدند که ۸۵ درصد سویه‌های \شریشـیا کلی حداقل یکی از ژن‌های حدت را دارند، درحالی‌که ۶۶ درصد از سویه‌های \شریشیا کلی جداشده از پرندگان به ظاهر سـالم برای حداقل یک ژن حدت مثبت در نظر گرفته شـدند (۲۴). نتایج تحقیق حاضر، باز هم نشان دهنده بکارگیری عواملی، غیر از ژن‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر، در جدایه‌های \شریشیا کلی شترمرغ برای ایجاد بیماری اسـت که نیاز به بررسـی ژن‌های حدت بیشـتری در این جدایه‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به تحقیق حاضر به نظر می‌رسد با توجه به فراوانی آماری یکسـان دو ژن *iss* و *bor* بین شـترمرغ‌های به ظاهر سالم و طیور مبتلا به کی‌باسیلوز احتمالاً مکانیزم‌های بیماریزایی باکتری در گونه‌های متفاوت با یکدیگر اختلاف دارند و برای تشـخیص بیماری کلی‌باسیلوز در شـترمرغ نسـبت به طیور کلی‌باسیلوزی، ژن *bor* مشـابه ژن *iss* کارایی زیادی در منطقه مورد مطالعه نخواهد داشت. عوامل بیماریزا تأثیر کم‌تری روی شترمرغ دارد یا این که عوامل حدت دیگری در بیماریزایی باکتری در این موجود نقش دارند. به علاوه، می‌توان شترمرغ را به عنوان منبعی برای جابجایی ژن *bor* بین طیور در منطقه مورد مطالعه در نظر گرفت و احتمالاً جدایه‌های \شریشیا کلی شترمرغ، عواملی، غیر از ژن‌های مورد مطالعه در تحقیـق حاضر را برای ایجاد بیماری در شـترمرغ به کار می‌گیرند که این مطلب نیاز به بررسی ژن‌های حدت بیشتری در این جدایه‌ها دارد.

## تشکر و قدردانی

این تحقیق به عنوان بخشـی از پایان نامه جهـت اخذ درجه دکتری عمومی دامپزشکی (خانم افسانه حسینی) به انجام رسیده است (شماره ثبت ۱۰۴۳۲). بدین وسـیله از مسئولین محترم معاونت پژوهشی دانشگاه زابل و کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی بویژه سرکار خانم سرگلزایی و جناب آقای سعید شهریاری قدردانی و سپاسگذاری می‌شود.

## تعارض در منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض در منافع گزارش نشده است.

## References

1. Abd El Tawab, A. A., Maarouf, A. A. A., Abd El Al, S. A., El Hofy, F. I., El Mougy, E. E. A. (2014). Detection of some virulence genes of avian pathogenic E.coli by polymerase chain reaction. Benha Vet Med J, 26 (2), 159-176.
2. Arabi, S., Jafarpour, M., Mirinargesi, M., Asl, S. B., Naghshbandi, R., Shabanpour, M. (2013). Molecular characterization of Avian Pathogenic *Escherichia coli* in broilers bred in Northern Iran. Glob Vet, 10(4), 382-386.
3. Barondess, J. J., Beckwith, J. (1990). A Bacterial virulence determant encoded by lysogenic coliphage λ. Nature, 346 (6287), 871-874. https://doi.org/10.1038/346871a0 PMID: 2144037
4. Barondess, J. J., Beckwith, J. (1994). *bor* gene of phage λ, involved in serum resistance, encodes a widely conserved outer membrane lipoprotein. J Bactriol, 177(5), 1247-1253. https://doi.org/10.1128/jb.177.5.1247-1253.1995
5. Bejaei, M., Cheng, K. M. (2014). A survey of current ostrich handling and transport practices in North America with reference to ostrich welfare and transportation guidelines set up in other countries. Poult Sci, 93(2), 296-306. https://doi.org/10.3382/ps.2013-03417 PMID: 24570450
6. Binns, M. M., Davis, L. D., Hardy, G. K. (1979). Cloned fragments of the plasmid Col V, I-K94 specifying virulence and serum resistance. Na-

www.SID.ir

Archive of SID


ture, 279(5716), 778-781. PMID: 377103

7. Delicato, E. R., de Brito, B. J., Gaziri, L. C. J., Vidotto, M. C. (2003). Virulence associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. Vet Microbiol, 94(2), 97–103. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00076-2 PMID: 12781478
8. Derakhshandeh, A., Zahraei Salehi, T., Muniesa, M. (2011). Expression and analysis of the complement resistant trait *Iss*, from *E.coli* strain χ1378 isolated from poultry colibacillosis in Iran. J Vet Res, 12(4), 241-245. https://doi.org/10.22099/ijvr.2011.78
9. Derakhshandeh, A., Zahraei Salehi, T., Tadjbakhsh, H., Karimi, V. (2009). Identification, cloning and sequencing of *Escherichia coli* strain χ1378 (O78:K80) *iss* gene isolated from poultry colibacillosis in Iran. Lett Appl Microbiol, 49 (3), 403–407. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02681.x PMID: 19622075
10. Dias da Silveira, W., Ferreira, A., Brocchi, M., Maria de Hollanda, L., Pestana de Castro, A. F., Tatsumi Yamada, A., Lancellotti, M. (2002). Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. Vet Microbiol, 85(1), 47-53. PMID: 11792491
11. Dou, X., Gong, J., Han, X., Xu, M., Shen, H., Zhang, D., Zhuang, D., Liu, J., Zou, J. (2015). Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated in eastern China. Gene, 576(1 Pt 2), 244–248. https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.012 PMID: 26475938
12. Holmes, D. S., Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the prepration of bacterial plasmids. Anal Biochem, 114(1), 193-197. PMID: 6269464
13. Huchzermeyer, F. W. (1997a). Animal health risks associated with ostrich products. Rev Sci Tech, 16(1), 111-6. PMID: 9329111
14. Huchzermeyer, F. W. (1997b). Public health risks of ostrich and crocodile meat. Rev Sci Tech, 16(2), 599-604. PMID: 9501374
15. Huchzermeyer, F. W. (2002). Diseases of farmed crocodiles and ostriches. Rev Sci Tech, 21(2), 265-76. PMID: 11974614
16. Huja, S., Oren, Y., Trost, E., Brzuszklewicz, E., Biran, D., Blom, J., Goesmann, A., Gottschalk, G., Hacker, J., Ron, E. Z., Dobrindt, U. (2015). Genomic avenue to avian coliseptisemia. MBio, 6(1), e01681-14. https://doi.org/10.1128/mBio.01681-14 PMID: 25587010
17. Jeong, Y. W., Kim, T. E., Kim, J. H., Kwon, H. J. (2012). Pathotyping avian pathogenic *Escherichia coli* strains in Korea. J Vet Sci, 13 (2), 145-152. https://doi.org/10.4142/jvs.2012.13.2.145 PMID: 22705736
18. Johnson, J. T., Johnson, J. S. Nolan, L. K. (2006a). Complete DNA sequence f a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. J Bacteriol, 188(16), 5975-5983. https://doi.org/10.1128/JB.00204-06 PMID: 16885466
19. Johnson, J. T., Siek, K. E., Johnson, S. J. Nolan, L. K. (2006b). DNA sequence of a ColV plasmid and prevaleance of selected plasmid encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. J Bacteriol, 188 (2), 745-758. https://doi.org/10.1128/JB.188.2.745-758.2006 PMID: 16385064
20. Johnson, J. T., Wannemuehler, Y. M., Doetkott, C., Johnson, J. R., Kim, K. S., Spanjaard, L., Nolan, L. K. (2008a). Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. Appl Environ Microbiol, 74(22), 7043-50. https://doi.org/10.1128/AEM.01395-08 PMID: 18820066
21. Johnson, J. T., Wannemuehler, Y. M., Doetkott, C., Johnson, S. J., Rosenberger, S. C., Nolan, L. K. (2008b). Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnosis tool. J Clin Microbiol, 46(12), 3987-3996. https://doi.org/10.1128/JCM.00816-08 PMID: 18842938
22. Johnson, J. T., Wannemuehler, Y. M., Nolan, L. K. (2008c). Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 74(8), 2360-2369. https://doi.org/10.1128/AEM.02634-07
23. Joiner, K. A. (1998). Complement evasion by

www.SID.ir

Archive of SID

bacteria and parasites. Ann Rev Microbiol, 42, 201-203. PMID: 3059994

24. Kafshdouzan, Kh., Zahraei Salehi, T., NayeriFasae, B., Madadgan, O., Yamasaki, Sh., Hinenoya, A., Yasuda, N. (2012). Distribution of virulence associated genes in isolated *Esherichia coli* from avian colibacillosis. Iran J Vet Med, 7(1), 1-6, https://doi.org/10.22059/ijvm.2013.32017
25. Khoshkhoo, P. H. and Peighambari, S. M. (2005). Drug resistance patterns and plasmid profiles of E.coli isolated from cases of avian colibacillosis. Journal of Veterinary Research, 60(2), 97-105.
26. Knobl, T., Baccaro, M. R., Moeno, A. M., Gomes, T. A. T., Vieira, M. A. M., Ferreira, C. S. A., Piantino Ferreira, A. J. (2001). Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from ostriches with respiratory disease. Vet Microbiol, 83(1), 71-80. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00403-5 PMID: 11524167
27. Li, Y., Chen, L., Wu, X., Huo, S. (2015). Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. Poult Sci, 94(4), 601-611. https://doi.org/10.3382/ps/pev008 PMID: 25667425
28. Lutful Kabir, S. M. (2010). Avian colibacillosis and salmonelosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. Int J Environ Res Public Health, 7(1), 89-114. https://doi.org/10.3390/ijerph7010089 PMID: 20195435
29. Lynne, A. M., Foley, S. L., Nolan, L. K. (2006a). Immune response to recombinant *Escherichia coli iss* protein in poultry. Avian Dis, 50(2), 6-273. https://doi.org/10.1637/7441-092105R.1 PMID: 16863080
30. Lynne, A. M., Skyberg, J. A., Logue, C. M., Doerkott, C., Foley, S. L., Nolan, L. K. (2007). Characterization of a series of transconjugant mutants of an avian pathogenic *Escherichia coli* isolate for resistance to serum complement. Avian Dis, 51(3), 771-776. PMID: 17992940
31. Lynne, A. M., Skyberg, J. A., Logue, C. M., Nolan, L. K. (2006b). Detection of *Iss* and *Bor* on the surface of *Escherichia coli*. J Appl Microbiol, 102(3), 660–666. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03133.x PMID: 17309614
32. Mohamadi, E., Alizade, H., Askari, N., Salehi, M., Porjafarian, M., Ghanbarpour, R. (2015). Antibiotic resistance profile in relation to phylogenetic ackground in *Escherichia coli* isolated from fecal samples of healthy ostriches. International Journal of Enteric Pathogens, 3(2), e25366. https://doi.org/10.17795/ijep25366
33. Nolan, L. K., Horne, S. M., Gidding, C. W., Foley, S. L., Johnson, T. J., Lynne, A. M., Skyberg, J. (2003). Resistance to serum complement, *iss*, and virulence of avian *Escherichia coli*. Vet Res Commun, 27(2), 101-110. https://doi.org/10.1023/A:1022854902700 PMID: 12718504
34. Nolan, L. K., Wooley, R.E., Cooper, R.K. (1992). Transposon mutagenesis used to study the role ofcomplement resistance in the virulence of an avian *Escherichia coli*. Avian Dis, 36(2), 398-402. PMID: 1320868
35. Ohadi, H., Haji Babaei, A., Ghaffori, S. A. (2006). Breeding and Diseases of Ostriches and Other-Related Birds. (1st ed.) Parto-Vaghe in collaboration with Danensh-Negar.Tehran, Iran. p. 71-75.
36. Reed, K. D., Meece, J. K., Henkel, J. S., Shukla, S. K. (2003). Birds, migration and emerging zoonoses: west nile virus, lyme disease, influenza A and enteropathogens. Clin Med Res, 1(1), 5-12. https://doi.org/10.3121/cmr.1.1.5 PMID: 15931279
37. Rezaei Far, A., Peighambari, S. M., Sadrzadeh, A., Askari Badouei, M. (2013). Bacterial contamination of dead-in-shell embroys in ostrich hatcheries and antimicrobial resistance petterns of isolated *Escherichia coli*. Iran J Vet Med, 7(3), 169-175. https://doi.org/10.22059/ijvm.2013.35967
38. Rodriguez-siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Nolan, L.K. (2005). Characterizing the APEC pathotype. Vet Res, 36(2), 241-256. https://doi.org/10.1051/vetres:2004057 PMID: 15720976
39. Salari, S., Zahraei Salehi, T., Nayeri Fasaei, B., Karimi, V. (2014). Construction of an *iss* de-

www.SID.ir

Archive of SID


leted mutant strain from a native avian pathogenic *Escherichia coli* O78: K80 and in vitro serum resistance evaluation of mutant. Iran J Vet Med, 8(1), 1-8. https://doi.org/10.22059/ijvm.2014.50556

40. Schouler, C., Schaeffer, B., Bree, A., Mora, A., Dahbi, G., Oswald, F. B. E., Mainil, J., Blanco, J., Moulin – Schouleur, M. (2012). Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. J Clin Microbiol, 50(5), 1673–1678. https://doi.org/10.1128/JCM.05057-11
41. Stewart, J. (2013). Ratites. In: Ritchie, B.W., Harrison, G. J., Harrison, L. R. (eds.), Avian Medicine- Principles and Application. Wingers Publishing Inc. Lake Worth, FL, USA. p. 1285-1326.
42. Tobias, F. L., Nunes Garcia, L. N., Masahiko Kanashiro, M., Medina-Acosta, E., Gato Brom-de-Luna, J.,Costa de Almeida, C. M., Azevedo Junior, R. R., Lemos, M., Vieira-da-Motta, O. (2012). Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains by neutralizing IgY antibodies from ostrich egg yolk. Braz J Microbiol, 43(2), 544–551. http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000200015
43. PMID: 24031862
Verwoerd, D. J. (2000). Ostrich diseases. Rev Sci
44. Tech, 19(2), 638-661. PMID: 10935285
Wen-jie, J., Zhi-ming, Z., Yong-zhi, Z., Ai-jian, Q., Hong-xia, S., Yue-long, L., Jiao, W., Qian-qian, W. (2008). Distribution of virulence-associated genes of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in China. Agric Sci China, 7(12), 1511-1515. https://doi.org/10.1016/S1671-
45. 2927(08)60410-1
Zahraei Salehi, T., Shayegh, J. (2008). Veterinary Microbiology and Microbial Diseases (Bacterial Pathogens). (2nd ed.) Univerity of Tehran Press.
46. Tehran, Iran. p. 185.
Zahraei Salehi, T., Derakhshandeh, A., Tadjbakhsh, H., Karimi, V. (2013). Comparison and phylogenetic analysis of the *ISS* gene in two predominant avian pathogenic *Escherichia coli* serogroups isolated from avian colibacillosis in Iran. Res Vet Sci, 94(1), 5–8. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.07.010 PMID: 22854600

www.SID.ir

# Presence of Two Genes Involved in Serum Resistance of *Escherichia coli* Isolated From Healthy Ostriches in Comparison With Infected Poultry by Colibacillosis

**Afsaneh Hosseini[1], Saeed Salari[2], Ahmad Rashki[2], Mohammad Jahantigh[3]**

[1]*DVM, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Sistan and Baluchistan, Iran*

[2]*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Sistan and Baluchistan, Iran*

[3]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Sistan and Baluchistan, Iran*

(Received 21 May 2018, Accepted 16 September 2018)

## Abstract:

**BACKGROUND:** The mechanism of pathogenesis and the role of virulence factors of avian pathogenic *E. coli* is still ill-defined. The ostrich industry is expanding, resulting in the interaction between poultry and ostrich. It is reported that the investigation of *iss* and *bor* virulence genes together, due to their structural and functional similarities, is valuable.

**OBJECTIVES:** The investigation and comparison of presence of two genes involved in serum resistance, *iss* and *bor*, in *E. coli* isolated from apparently healthy ostriches and poultry with colibacillosis.

**METHODS:** As a cross-sectional study, *E. coli* was recovered from fecal samples of apparently healthy ostriches and poultry with colibacillosis, and *iss* and *bor* genes were screened and compared via PCR in *E. coli* isolates.

**RESULTS:** *iss* frequencies, with no statistical difference, were 50% and 64.4% in *E. coli* isolated from apparently healthy ostriches and poultry with colibacillosis, respectively ($P>0.05$). 31.8% and 15.6% of *E. coli* isolated from apparently healthy ostriches and poultry with colibacillosis were positive for *bor*, respectively, with no statistical difference ($P>0.05$). 11.1% of isolates from colibacillosis and 18.2% of isolates from apparently healthy ostriches feces, with no statistical difference, were positive for both genes ($P>0.05$).

**CONCLUSIONS:** Equal statistical distribution of both genes, *bor* and *iss*, between apparently healthy ostriches and poultry with colibacillosis and the health level of studied ostriches indicated that *E. coli* isolated from ostrich, probably employs other virulence factors instead of *bor* and *iss* to establish a disease. This hypothesis needs to examine more virulence genes in ostrich-origin *E. coli*. In addition, the ostrich feces could be introduced as a source of *iss* and *bor* genes.

## Keywords:

*bor*, Colibacillosis, *Escherichia coli*, *iss*, Ostrich

### *Figure Legends and Table Captions*

**Table 1.** Primers used for PCR reaction of *iss* and *bor* genes.

**Table 2.** Frequency of virulence genes in *E. coli* isolated from apparently healthy ostriches and poultry infected with colibacillosis.

**Figure 1.** Gel electrophoresis of PCR product of *iss*; L: 250 bp Ladder; Lane 1: Positive control (χ1378); Lane 2: Negative control; Lane 3, 4: Sampled from apparently healthy ostriches; Lane 5, 6: Sampled from poultry colibacillosis.

**Figure 2.** Gel electrophoresis of PCR product of *bor*; L: 250 bp Ladder; Lane 1: Positive control (χ1378); Lane 2, 3: Sampled from apparently healthy ostriches; Lane 4, 5: Sampled from poultry colibacillosis.

***Corresponding author's email: saeedsalari@uoz.ac.ir, Tel: 0542-4822278, Fax: 0542-4822251**

www.SID.ir