Archive of SID

جستجوی فراوانی ژن‌های *iucD*، *tsh* و *iss* در جدایه‌های *اشریشیا کلی* طیور گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز

حسین نیک‌پیران[۱*]، سیدمصطفی پیغمبری[۲] و اکبر عبدی‌خاصوان[۳]

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۶

چکیده

اشریشیاکلی (*E. coli*) جزو فلور طبیعی روده‌های انسان، پستانداران و پرندگان است، اما برخی از سویه‌های *اشریشیاکلی* به واسطه‌ی داشتن برخی از عوامل حدت، بیماری‌زا می‌باشند. هدف از مطالعه‌ی حاضر تعیین میزان فراوانی ژن‌های *iucD*، *tsh*، و *iss* در گله‌های مرغ گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز استان آذربایجان شرقی بود. جهت اجرای مطالعه تعداد ۱۱۷ جدایه *اشریشیاکلی* از طیور گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز که دارای علائم پری‌کاردیت، پری‌هپاتیت و عفونت کیسه‌های هوایی بودند مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام آزمایش‌های استاندارد و انجام کشت، به منظور بررسی ژنوتیپی جدایه‌ها سه ژن *iucD*، *tsh* و *iss* با استفاده از پرایمرهای استاندارد معرفی شده و آزمایش واکنش زنجیره‌ی پلیمراز مورد ارزیابی قرار گرفتند. تعداد ۲۹ نمونه (۲۴/۷۸ درصد) از نظر وجود هر سه ژن (*iucD*، *iss*، *tsh*) مثبت بودند و تعداد ۲۹ (۲۴/۷۸ درصد)، ۳۹ (۳۳/۳۳ درصد) و ۴۴ (۳۷/۶۰ درصد) نمونه به ترتیب از نظر ترکیب دوگانه‌ی ژن‌های *tsh/iss*، *tsh/iucD* و *iss/iucD* مثبت بودند. همچنین ۳۴/۱۸ درصد، ۳۷/۶۰ درصد و ۹۱/۴۵ درصد جدایه‌ها به ترتیب واجد ژن *tsh*، *iss* و *iucD* بودند. نتایج مطالعه نشان داد که درصد بالایی از جدایه‌های مورد بررسی توانایی تولید آئروباکتین را دارند، همچنین در موارد بررسی ترکیب‌های مختلف ژن‌های مورد بررسی در ۲۴/۷۸ تا ۳۷/۶۰ درصد جدایه‌ها مشاهده شد. چنین به نظر می‌رسد که بررسی‌های بیش‌تری جهت ارزیابی عوامل حدت ای‌کلی در مرغداری‌های استان آذربایجان‌شرقی نیاز است.

کلمات کلیدی: *اشریشیاکلی*، کلی باسیلوز، ژن *tsh*، ژن *iss*، ژن *iucD*

مقدمه

اشریشیاکلی باکتری میله‌ای شکل، گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری بود و در خانواده‌ی انتروباکتریاسه قرار می‌گیرد. این باکتری عمدتاً در دستگاه روده‌ای انسان، پستاندارن و پرندگان رشد و تکثیر می‌نماید. سویه‌های *اشریشیاکلی* معمولاً محدود به لومن روده می‌باشند، اما در اثر ضعف سیستم ایمنی میزبان یا در اثر نقص در سیستم گوارشی این باکتری می‌تواند موجب بروز بیماری‌های عفونی گردد (Dziva et al. 2013)، همچنین در پرندگان سویه‌های بیماری‌زای *اشریشیاکلی* موجب بروز بیماری تنفسی می‌گردند (Ammar et al. 2017, Kaper et al. 2004).

سویه‌های بیماری‌زا *اشریشیاکلی* پرندگان منجر به بروز بیماری‌های مختلفی می‌گردند که عمدتاً خارج روده‌ای بوده و باعث ایجاد خسارت‌های گسترده‌ای در صنعت طیور می‌گردد (Manohar and Moorthy 2004) و شامل التهاب مجرای تخم‌بر، که منجر به کاهش تولید تخم‌مرغ و تلفات اندک در مرغان تخم‌گذار و گله‌های مادر شده و سالپنژیت همراه با پریتونیت، نیز عارض می‌گردد (Nolan et al. 2013). با این حال مهم‌ترین بیماری ناشی از سویه‌های بیماری‌زا *اشریشیاکلی* پرندگان، کلی سپتی‌سمی بوده و به نظر می‌رسد که این بیماری عفونی به دنبال بروز

[۱*] استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاداسلامی E-mail: nikpiran20@iaut.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] استاد گروه بیماری‌های طیور، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران

[۳] دامپزشک بخش خصوصی، زنجان

www.SID.ir

Archive of SID

عفونت اولیه با ویروس‌های برونشیت عفونی، نیوکاسل و یا مایکوپلاسماها ایجاد می‌گردد (Nolan et al. 2013). عفونت‌های اولیه مذکور با ایجاد نقص در مژک‌های سلول‌های سیستم تنفسی فوقانی و تأثیر آمونیاک و گرد و غبار موجود در محل پرورش موجب افزایش حساسیت پرندگان به سویه‌های بیماری‌زا *اشریشیاکلی* پرندگان شده و روند بروز بیماری را تسریع می‌نمایند (Botus et al. 2015). این عفونت تحت عنوان بیماری کیسه‌های هوایی نیز شناخته می‌شود و در سن ۲ تا ۱۲ هفتگی می‌تواند پرندگان را مبتلا نماید و تلفات می‌تواند تا ۲۰ درصد نیز افزایش یابد (Dho-Moulin and Fairbrother 1999).

پلاسمید *اشریشیاکلی* بیماری‌زا پرندگان، دارای چندین فاکتور حدت مشخص می‌باشد. اگر چه برخی از این عوامل حدت از *اشریشیاکلی* جدا شده است، همچنین از پرندگان سالم نیز گزارش شده‌اند (Kawano et al. 2006, Mcpeake et al. 2005, Rodriguez-Siek et al. 2005). اما بدون تردید، پلاسمید، *اشریشیاکلی* بیماری‌زای پرندگان حامل تعداد قابل توجهی از ژن‌های حدت می‌باشد که منجر به تعریف ژنوتیپ *اشریشیاکلی* بیماری-زای پرندگان می‌گردد. به ویژه، یک ناحیه‌ی ۹۴ کیلوبازی از ۱۸۰ کیلوباز پلاسمید ColV حاوی ژن‌های رمزکننده کسب آهن و سیستم انتقال آن می‌باشد که در *اشریشیاکلی* بیماری‌زا پرندگان شیوع بیش‌تری نسبت به *اشریشیاکلی* مدفوعی پرندگان دارد (Johnson et al. 2006). همچنین رابطه‌ی بین حدت *اشریشیاکلی* بیماری‌زای پرندگان و دارا بودن پلاسمید ColV در مطالعات مختلف گزارش شده است (Gibbs et al. 2003, Mohsenifard et al. 2016, Tivendale et al. 2004). بر اساس مطالعات اخیر، سویه‌های جدا شده از بیماری در صورتی به عنوان *اشریشیاکلی* بیماری‌زای پرندگان دسته‌بندی می‌شوند که دارای حداقل ۴ ژن از هشت ژن ذیل باشند: فیمبریه p (*papC*)، آئروباکتین (*iucD*)، پروتئین کنترل کننده‌ی آهن (*irp2*)، هماگلوتینین حساس به دما (*tsh*)، پروتئین خود مبدل حفره‌دار (*vat*)، توکسین جمع‌شونده در روده (*astA*)، پروتئین افزایش بقاء سرمی (*iss*)، و ژن‌های اپرون پلاسمید کلیسین (*cvalcvi*) (Ewers et al. 2005, Ngeleka et al. 2002).

با وجود کمبود اطلاعات کافی در مورد ژن‌های ضروری برای تحریک عفونت سیستمیک ناشی از *اشریشیاکلی* بیماری‌زا پرندگان، اما مطالعات پیشین نشان داده است که ترکیبی از پاتوتیپ‌های *tsh/pil/iuc* و *tsh/pap/iuc* و مارکرهای مرتبط با حدت *iuc* و *tsh* از عوامل مهم در مورد *اشریشیاکلی* بیماری‌زا پرندگان می‌باشد (Ngeleka et al. 2002) . همچنین ارتباط محدودی بین الگوی ژن حدت و گروه‌های سرمی سویه‌های *اشریشیاکلی* بیماری‌زا پرندگان ذکر شده است (Ewers et al. 2004).

در مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی ژنوتیپی کلی باسیلوز، میزان بروز و فراوانی ژن‌های iucD، tsh و iss در جدایه‌های باکتری *اشریشیاکلی* آلوده کننده در گله‌های طیور استان آذربایجان شرقی مورد بررسی و ارزیابی قرا گرفت.

مواد و روش کار

به منظور اجرای مطالعه، تعداد ۱۱۷ جدایه *اشریشیاکلی* (از ضایعات تیپیک مرغان مبتلا به کلی‌باسیلوز مانند پری‌کاردیت، پری‌هپاتیت، کیسه‌های هوایی عفونی) از مرغداری‌های گوشتی ارجاعی به بخش بیماری‌های طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز جداسازی گردید، که در مجموع تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده مربوط به ۲۵ گله‌ی گوشتی در استان آذربایجان شرقی بود.

جهت کشت و جداسازی باکتری بر اساس روش‌های استاندارد اقدام گردید. بدین منظور در کنار شعله‌ی بعد از داغ کردن کبد، قلب و کیسه‌های هوای در آزمایشگاه نمونه‌برداری و در محیط کشت مکانکی کشت (Nolan et al. 2013, Quinn et al. 1994)، سپس در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده و در صورت رشد

www.SID.ir

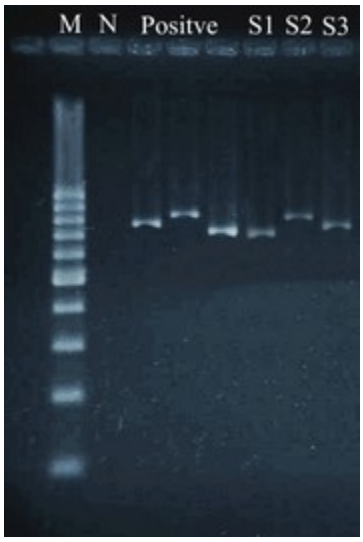
Archive of SID

باکتری و ایجاد کلنی صورتی، آن محیط را انتخاب و بعد از ثبت نتایج در یک محیط عمومی خالص‌سازی نموده و بعد از رشد کافی از نظر آزمایش‌های کاتالاز (مثبت)، اکسیداز (منفی) و لاکتوز (مثبت) بررسی و سپس جهت تائید نهایی از آزمایش IMViC استفاده گردید (Tille 2013). سپس باکتری‌های حاصله در محیط آبگوشت حاوی گلیسرول استریل و در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا استفاده بعدی نگهداری شد. برای استخراج DNA همه‌ی نمونه‌ها در محیط مایع LB (Luria-Bertani) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند.

برای استخراج DNA همه‌ی نمونه‌ها در محیط مایع LB (Luria-Bertani) کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. برای استخراج DNA باکتری، یک سی‌سی از هر نمونه را داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ سی‌سی ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰g سانتریفیوژ شدند، پس از حذف مایع رویی، نمونه‌ها در ۳۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل مخلوط و ۱۰ دقیقه جوشانده شدند و سپس در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد گرفته و مجدداً پس از آن به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتیریفیوژ شدند. مایع رویی به عنوان DNA باکتری جهت استفاده در آزمایش PCR به دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شدند. پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های مورد مطالعه در جدول ۱ تشریح شده است.

سپس با توجه به روش ذکر شده توسط Janben و همکاران در سال ۲۰۰۱، برای ژن‌های *iucD* و *tsh* و روش توصیف شده توسط Horne و همکاران در سال ۲۰۰۰، برای ژن *iss*، محلول واکنش PCR تهیه شده و در دستگاه ترموسایکلر با برنامه‌ی دمایی ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد (واسرشت اولیه) به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل شامل : ۱۰ ثانیه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد (واسرشت)، ۱۰ ثانیه در ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد (اتصال) و ۲۰ ثانیه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (طویل شدن) و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (طویل شدن نهایی) بود. روش مورد استفاده نیز از نوع مونوپلکس بود.

برای مشاهده‌ی محصول PCR، ۸ میکرولیتر از هر نمونه را به همراه بافر بارگذاری داخل گودهای ژل آگاروز ۱/۵ درصد تهیه شده با بافر TBE برده و الکتروفورز به مدت ۹۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ ولت انجام گردید، از گوده اول و آخر هر ژل مارکر برای اندازه‌گیری اندازه‌ی ژن استفاده شد. پس از اتمام الکتروفورز ژل با اتیدیوم بروماید رنگ شده و پس از شستشو به وسیله‌ی لامپ UV بررسی گردید.



شکل ۱: تصویر ژل، M: مارکر، N: کنترل منفی، Positive: نمونه‌های کنترل مثبت، S1، S2، S3 نمونه‌های مورد آزمایش

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده و محصول PCR

منبع	ژن	محل ژن	اندازه آمپلیکون جفت باز	توالی پرایمر
Janßen et al. (2001)	*iucD*	۲۵۹–۲۳۹	۷۱۴	F: 5'-ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC-3'
		۹۳۱–۹۱۳		R: 5'-CCTGATCCAGATGATGCTC-3'
Janßen et al. (2001)	*tsh*	۳۰۱۲–۲۹۹۲	۸۰۴	F: 5'-GTGATAAACAAGTCGGCAACA-3'
		۳۷۹۶–۳۷۷۸		R: 5'-GCATTGAGACATCCATTCC-3'
Horne et al. (2000)	*iss*	۵۰۰–۴۷۸	۷۶۰	F: 5'-GTGGCGAAAACTAGTAAAACAGC-3'
		۱۱۳۶–۱۱۲۰		R: 5'-CGCCTCGGGGTGGATAA-3'

نتایج

از نمونه‌های مشکوک به کلی باسیلوز با علایم مشخص و بارز کلی باسیلوز ارجاع داده شده از مرغداری‌های مختلف به کلینیک دانشکده دامپزشکی، تعداد ۱۱۷ نمونه *اشریشیاکلی* تشخیص و جداسازی شد. نتایج بررسی ژن‌های حدت در *اشریشیاکلی* جدا شده با آزمایش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای هر ژن نیز در جدول ۳ نشان داده شده است.

بر اساس نتایج حاصله، تعداد ۲۹ نمونه (۲۴/۷۸ درصد) از نظر وجود هر سه ژن (*iucD*، *iss*، *tsh*) مثبت بودند و تعداد ۲۹ (۲۴/۷۸ درصد)، ۳۹ (۳۳/۳۳ درصد) و ۴۴ (۳۷/۶۰ درصد) نمونه به ترتیب از نظر ترکیب دوگانه‌ی ژن‌های *tsh/iss*، *tsh/iucD* و *iss/iucD* مثبت بودند. میزان فراوانی هر یک از ژن‌ها در جدول ۲ ذکر شده است.

جدول ۲: میزان فراوانی و درصد ژن‌های حدت مورد بررسی در نمونه‌های ارزیابی شده

ژن	*tsh*	*iss*	*iucD*	*tsh/iss*	*tsh/iucD*	*iss/iucD*	*iucD* ،*iss* ،*tsh*
تعداد	۴۰	۴۴	۱۰۷	۲۹	۳۹	۴۴	۲۹
درصد	۳۴/۱۸	۳۷/۶۰	۹۱/۴۵	۲۴/۷۸	۳۳/۳۳	۳۷/۶۰	۲۴/۷۸

بحث

اشریشیاکلی بیماری‌زای پرندگان باعث ایجاد انواع مختلف بیماری‌ها در پرندگان می‌شود که همراه با خسارت‌های فراوان برای صنعت طیور می‌باشد. مطالعه‌ی محققین نشان داده است که برخی فاکتورهای اصلی حدت دارای اهمیت ویژه‌ای در *اشریشیاکلی* بیماری‌زای پرندگان (Avian Pathogenic Escherichia coli, APEC) می‌باشند که عمدتاً عبارتند از توانایی چسبندگی، تولید کلیسین، حضور آئروباکتین، هماگلوتینین حساس به دما، پروتئین افزایش بقای سرمی و وجود برخی آنتی‌ژن‌های کپسولی (De Brito et al. 2003, Delicato et al. 2003, Dho and Lafont 1982, Mcpeake et al. 2005, Ngeleka et al. 2002).

در مطالعه‌ی حاضر، میزان فراوانی و حضور ژن‌های *iucD*، *tsh* و *iss* از باکتری‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از طیور مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت.

عملکرد ژن بقای سرمی *iss*، به واسطه‌ی لیپوپلی‌ساکارید ساختاری سطحی (LPS) کپسول و سایر پروتئین‌های غشایی، حضور پروتئین‌های غشای خارجی

www.SID.ir

Archive of SID

و آنتی‌ژن‌های K1 و K2 بوده (Gross 1994) و توسط ژن‌های *kps* رمز می‌شود (Johnson et al. 2005). برخی پلاسمیدها نیز توانایی انتقال ژن بقای سرمی را به سلول‌های گیرنده حساس دارا می‌باشند. همچنین ژن‌های *iss*، در پلاسمیدهای pColV-I-K94 شناسایی شده است، که در حقیقت این پروتئین وابسته به مقاومت کمپلکس سایتوتوکسیک می‌باشد (Binns et al. 1979) . نتایج پژوهشگران نشان می‌دهد با توجه به این که ژن *iss* غالباً در سویه‌های بیماری‌زای پرندگان یافت می‌شود، بنابراین فاکتور *iss* با بیماری‌زایی APEC در ارتباط می‌باشد (Pfaff-Mcdonough et al. 2000).

نتایج مطالعات پژوهشگران از حضور ژن *iss* در درصد بالایی از موارد APEC می‌باشد. در مطالعات مختلف میزان درصد موارد *iss* جدا شده، ۷۳/۸ درصد (Rocha et al. 2008)، ۷۲/۸ درصد (Mcpeake et al. 2005)، ۷۷ درصد (Pfaff-Mcdonough et al. 2000)، ۸۱/۵ درصد (Rodriguez-Siek et al. 2005)، ۸۲/۷ درصد (Ewers et al. 2004)، ۳۸/۵ درصد (Delicato et al. 2003)، ۲۶ درصد (Knöbl et al. 2012) و ۳۳/۳ درصد در نمونه‌های غیر روده‌ای و ۴۲/۹ درصد در نمونه‌های روده‌ای (Mohamed et al. 2014) گزارش شده است. با وجود گزارش درصد بالایی از موارد مثبت ژن *iss* در مطالعات پیشین در مطالعه‌ی حاضر تنها در ۳۷/۶۰ درصد موارد این ژن در آزمایش PCR تشخیص داده شد، که البته با نتایج Mohamed و همکاران در سال ۲۰۱۴ همسو می‌باشد.

ژن *iss* در درصد بالایی (۷۲/۲ درصد) از سویه‌های غیرروده‌ای در پرندگان بیمار گزارش شده است در حالی که در سویه‌های روده‌ای و مدفوعی این ژن گزارش نشده است که می‌تواند اهمیت بیماری‌زایی این ژن را نشان دهد (Mohamed et al. 2014). در ایالات متحده ۸۵/۴ درصد سویه‌های APEC جدا شده از جراحات پرندگان مبتلا به کلی باسیلوز بالینی از نظر ژن *iss* مثبت بوده‌اند (Dissanayake et al. 2014). همچنین در ۸۲/۷ درصد از سویه‌های APEC جداسازی شده از مرغ‌های مبتلا به کلی سپتی‌سمی در آلمان ژن *iss* حضور داشت (Janßen et al. 2001). در مطالعه پژوهشگران در برزیل میزان بروز ژن *iss* از APEC های جدا شده از طیور مبتلا به کلی باسیلوز کم‌تر و در حدود ۳۸/۵ درصد بود (Delicato et al. 2003). همچنین میزان بروز ژن *iss* در ۱۸/۷ درصد از جدایه‌های مدفوعی پرندگان سالم غیربیمار نیز گزارش شده است (Rodriguez-Siek et al. 2005) . نتایج مطالعه‌ی پژوهشگران نشان داد که در پرنده‌های بیمار در ۳۸/۴۶ درصد موارد ژن *iss* حضور داشته است (Rad and Kooshan 2016).

پژوهشگران گزارش نموده‌اند که هماگلوتینین در نمونه‌های *اشریشیاکلی* در دمای ۲۴-۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد شناسایی می‌شود و به همین دلیل نیز هماگلوتینین حساس به حرارت نیز نامیده می‌شود و تحت عنوان ژن *tsh* نام‌گذاری شده است (Provence and Curtiss 1994). هماگلوتینین حساس به حرارت نقش بسیار مهمی را در کلونیزه شدن باکتری در کیسه‌های هوایی دارد (Dozois et al. 2000) . در مطالعه‌ی پژوهشگران از نمونه‌های اخذ شده از بستر طیور میزان درصد نمونه‌های مثبت ۵۵/۷ درصد بود (Rocha et al. 2008)، همچنین میزان درصد شیوع این ژن ۵۳/۳ درصد (Ewers et al. 2004)، ۸۵/۳ درصد (Janßen et al. 2001)، ۹۳/۹۵ درصد (Mcpeake et al. 2005)، ۹۹ درصد (Ngeleka et al. 2002)، ۳۹/۵ درصد (Delicato et al. 2003)، ۲۸ درصد (Knöbl et al. 2012) و ۲۸ درصد (Mohamed et al. 2014) گزارش شده است. در مطالعه‌ی حاضر نیز از ۳۴/۱۸ درصد موارد جدا شده ژن *tsh* ردیابی گردید، که نسبت به مطالعات پیشین میزان کم‌تر می‌باشد ولی با این حال نسبت به مطالعه‌ی Knöbl و همکاران در سال ۲۰۱۲ و Mohamed و همکاران در سال ۲۰۱۴ که میزان بروز ژن *tsh* را ۲۸ درصد گزارش نموده‌اند بیش‌تر می‌باشد. ژن *tsh* در ۶۷/۳ از جدایه‌های پاتوژنیک جدا شده است، اما تنها در ۲۷/۳ درصد از جدایه‌های مدفوعی ژن *tsh* مثبت بوده است (Rad and Kooshan 2016). نتایج بررسی در گله‌های

www.SID.ir

Archive of SID

گوشتی در شهر تبریز نشان داد که در ۴۹/۳ درصد از جدایه‌های اشریشیاکلی ژن حدت *tsh* وجود داشته است (Hasani et al. 2017).

ژن *iucD* یکی از مهم‌ترین ژن‌های دخیل در بیوسنتز آئروباکتین می‌باشد، که البته اختلاف قابل توجهی بین میزان تولید آئروباکتین توسط *اشریشیاکلی* بیماری‌زای طیور در مقایسه با جدایه‌های حاصل از طیور سالم وجود دارد. نتایج پژوهشگران نشان داده است که در ۵۶ تا ۹۸ درصد جدایه‌های به دست آمده از بیماری، *اشریشیاکلی*-های جدا شده، تولید کننده‌ی آئروباکتین بوده‌اند، در حالی که در جدایه‌های حاصل از جوجه‌های سالم در ۱۶ تا ۳۱ درصد موارد توانایی تولید آئروباکتین را داشتند (Ngeleka et al. 1996, Parreira et al. 1998, Peighambari et al. 1995). در مطالعات مختلف میزان فراوانی ژن آئروباکتین بین ۴۴ تا ۸۳ درصد در جدایه‌های *اشریشیاکلی* از سلولیت کلی‌فرمی گزارش شده است (De Brito et al. 2003, Gomis et al. 2000, Ngeleka et al. 1996). نتایج پژوهشگران در یک مطالعه در سال ۲۰۰۵ نشان داد که تمام جدایه‌های *اشریشیاکلی* بیماری‌زا به دست آمده از کلی باسیلوز طیور دارای ژن *iucD* بودند و از ۹ جدایه مربوط به جدایه‌های غیربیماری‌زا تنها در ۳ مورد ژن *iucD* شناسایی شد (Ewers et al. 2005). پژوهشگران از ۸۲/۶۹ درصد موارد ابتلا به کلی‌بیاسیلوزیس ژن iuc را در طیور جدا نموده‌اند و در ۹۰/۹ درصد از پرنده‌های سالم نیز این ژن گزارش گردیده است (Rad and Kooshan 2016).

در مطالعه‌ی پژوهشگران در طیور صنعتی در ایران در ۸۶ درصد از *اشریشیاکلی*‌های جدا شده توانایی تولید آئروباکتین را داشتند (Haghighi and Peyghambari 2004, Yazdani et al. 2013) و در ۹۶ درصد موارد نیز ژن *iucD* به عنوان مهم‌ترین ژن دخیل در بیوسنتز آئروباکتین شناسایی شد (Yazdani et al. 2013). نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز از حضور ژن *iucD* در ۹۱/۴۵ درصد جدایه‌های مورد ارزیابی می‌باشد که با نتایج حاصل از مطالعات قبلی هم‌خوانی دارد.

نتایج مطالعه‌ی پژوهشگران نشان داد که ژن‌های مارکر وابسته به حدت، شامل *tsh* و *iucD* از اکثر جدایه‌های با منشاء بافت‌های احشایی (کیسه‌های هوایی، پریکارد، کبد) به ترتیب در ۹۰/۴ درصد و ۹۲/۳ درصد موارد جدا شده، در حالی که از بافت کلوآک به ترتیب در ۵۱/۹ درصد و ۶۳/۵ درصد موارد ردیابی گردید (Ngeleka et al. 2002). همچنین نتایج مطالعه‌ی مذکور نشان داد که پاتوتیپ‌های *tsh/pil/iuc* و *tsh/pap/iuc* و ژن‌های *tsh* و *iuc* از فاکتورهای مهم در بیماری‌زایی باکتری‌های APEC می‌باشند. نتایج پژوهشگران نشان داد که هر سه ژن *tsh*، *iucD* و *iss* در جدایه‌های طیور وجود داشته است (Nateghi et al. 2010).

نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر نشان داد که درصد بالایی از جدایه‌های مورد بررسی توانایی تولید آئروباکتین را دارند، همچنین در موارد بررسی ترکیب ژن‌های مورد بررسی در ۲۴/۷۸ تا ۳۷/۶۰ درصد جدایه‌ها مشاهده شد. چنین به نظر می‌رسد که بررسی‌های بیش‌تری جهت ارزیابی عوامل حدت *اشریشیاکلی* در مرغداری‌های استان آذربایجان‌شرقی نیاز است. علاوه بر این جهت ارزیابی ژن‌های مذکور نیاز به مطالعات بیش‌تری است تا پتانسیل بیماری‌زایی آن‌ها مورد بررسی دقیق قرار گیرد. همچنین بایستی سایر ژن‌های مرتبط با حدت نیز مورد بررسی و ارزیابی دقیق قرا گیرد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

Ammar, A.M.; El-Aziz, N.K.A.; Nasef, S.A.; Bakry, N.R.; El Atfehy, N.M.; Erfan, A.M. et al. (2017). Use of Multiplex Pcr for Detection of Bacterial Respiratory Infections in Poultry. Zagazig Veterinary Journal, 42 (3): 133-144.

Binns, M.; Davies, D. and Hardy, K. (1979). Cloned Fragments of the Plasmid Colv, I-K94 Specifying Virulence and Serum Resistance. Nature, 279 (5716): 778-781.

Botus, D.; Popa, V.; Nogy, L.; Cotter, J.; Culcescu, M.; Caplan, E. et al. (2015). Aspects Regarding to Respiratory Diseases in Poultry Farms from Romania During 2013-2014 Determined by Elisa and Pcr Assays. Lucrari Stiintifice-Universitatea de Stiinte Agricole a Banatului Timisoara, Medicina Veterinara, 48 (2): 23-35.

De Brito, B.G.; Gaziri, L.C.J. and Vidotto, M.C. (2003). Virulence Factors and Clonal Relationships among Escherichia Coli Strains Isolated from Broiler Chickens with Cellulitis. Infection and immunity, 71 (7): 4175-4177.

Delicato, E.R.; De Brito, B.G.; Gaziri, L.C.J. and Vidotto, M.C. (2003). Virulence-Associated Genes in Escherichia Coli Isolates from Poultry with Colibacillosis. Veterinary Microbiology, 94 (2): 97-103.

Dho-Moulin, M. and Fairbrother, J.M. (1999). Avian Pathogenic Escherichia Coli (Apec). Veterinary Research, 30 (2): 299-316.

Dho, M. and Lafont, J.P. (1982). Escherichia Coli Colonization of the Trachea in Poultry: Comparison of Virulent and Avirulent Strains in Gnotoxenic Chickens. Avian Diseases, 26 (4): 787-797.

Dissanayake, D.; Octavia, S. and Lan, R. (2014). Population Structure and Virulence Content of Avian Pathogenic Escherichia Coli Isolated from Outbreaks in Sri Lanka. Veterinary Microbiology, 168 (2): 403-412.

Dozois, C.M.; Dho-Moulin, M.; Brée, A.; Fairbrother, J.M.; Desautels, C. and Curtiss, R. (2000). Relationship between the Tsh Autotransporter and Pathogenicity of Avian Escherichia Coli and Localization and Analysis of the Tsh Genetic Region. Infection and Immunity, 68 (7): 4145-4154.

Dziva, F.; Hauser, H.; Connor, T.R.; Van Diemen, P.M.; Prescott, G.; Langridge, G.C. et al. (2013). Sequencing and Functional Annotation of Avian Pathogenic Escherichia Coli Serogroup O78 Strains Reveal the Evolution of E. Coli Lineages Pathogenic for Poultry Via Distinct Mechanisms. Infection and Immunity, 81 (3): 838-849.

Ewers, C.; Janßen, T.; Kießling, S.; Philipp, H.C. and Wieler, L.H. (2005). Rapid Detection of Virulence-Associated Genes in Avian Pathogenic Escherichia Coli by Multiplex Polymerase Chain Reaction. Avian Diseases, 49 (2): 269-273.

Ewers, C.; Janßen, T.; Kießling, S.; Philipp, H.C. and Wieler, L.H. (2004). Molecular Epidemiology of Avian Pathogenic Escherichia Coli (Apec) Isolated from Colisepticemia in Poultry. Veterinary Microbiology, 104 (1): 91-101.

Gibbs, P.S.; Maurer, J.J.; Nolan, L.K. and Wooley, R.E. (2003). Prediction of Chicken Embryo Lethality with the Avian Escherichia Coli Traits Complement Resistance, Colicin V Production, and Presence of the Increased Serum Survival Gene Cluster (Iss). Avian Diseases, 47 (2): 370-379.

Gomis, S.; Gomis, A.; Horadagoda, N.; Wijewardene, T.; Allan, B. and Potter, A. (2000). Studies on Cellulitis and Other Disease Syndromes Caused by Escherichia Coli in Broilers in Sri Lanka. Tropical Animal Health and Production, 32 (6): 341-351.

Gross, W. (1994). Diseases Due to Escherichia Coli in Poultry. in: Gyles C.L. (Ed.), Escherichia coli in Domestic Animals and Man, CAB International, Wallingford, UK. Pp: 237-259.

Haghighi, K.P. and Peyghambari, S. (2004). Characteristics of Escherichia Coli Isolated from Cases of Avian Colibacillosis. Journal of Veterinary Research, 59 (3): 233-240.

Hasani, B.; Banani, M.; Nouri, A.; Goudarzi, H. and Akhijahani, M. (2017). Detection of Three Virulence Genes and Antibiotic Resistance Profiles in Escherichia Coli Isolates from Commercial Broilers with Colibacillosis in Tabriz, Iran. Archives of Razi Institute, 72 (1): 1-8.

Horne, S.M.; Pfaff-Mcdonough, S.J.; Giddings, C.W. and Nolan, L.K. (2000). Cloning and Sequencing of the Iss Gene from a Virulent Avian Escherichia Coli. Avian Diseases: 44(1): 179-184.

Janben, T.; Schwarz, C.; Preikschat, P.; Voss, M.; Philipp, H.C. and Wieler, L.H. (2001). Virulence-Associated Genes in Avian Pathogenic Escherichia Coli (Apec) Isolated from Internal Organs of Poultry Having Died from Colibacillosis. International Journal of Medical Microbiology, 291 (5): 371-378.

www.SID.ir

Archive of SID

Johnson, T.J.; Siek, K.E.; Johnson, S.J. and Nolan, L.K. (2006). DNA Sequence of a Colv Plasmid and Prevalence of Selected Plasmid-Encoded Virulence Genes among Avian Escherichia Coli Strains. Journal of Bacteriology, 188 (2): 745-758.

Johnson, J.R.; Kuskowski, M.A.; Gajewski, A.; Soto, S.; Horcajada, J.P.; De Anta, M.T.J. et al. (2005). Extended Virulence Genotypes and Phylogenetic Background of Escherichia Coli Isolates from Patients with Cystitis, Pyelonephritis, or Prostatitis. Journal of Infectious Diseases, 191 (1): 46-50.

Kaper, J.B.; Nataro, J.P. and Mobley, H.L. (2004). Pathogenic Escherichia Coli. Nature Reviews Microbiology, 2 (2): 123-140.

Kawano, M.; Yaguchi, K. and Osawa, R. (2006). Genotypic Analyses of Escherichia Coli Isolated from Chickens with Colibacillosis and Apparently Healthy Chickens in Japan. Microbiology and Immunology, 50 (12): 961-966.

Knöbl, T.; Micke Moreno, A.; Paixao, R.; Gomes, T.A.T.; Vieira, M.A.M.; Da Silva Leite, D. et al. (2012). Prevalence of Avian Pathogenic Escherichia Coli (Apec) Clone Harboring Sfa Gene in Brazil. The Scientific World Journal, 2012 (1): 1-7.

Manohar, R. and Moorthy, A. (2004). Isolation of Escherichia Coli from Suspected Cases of Chronic Respiratory Disease in Poultry. Indian Journal of Animal Sciences, 74 (6): 614-615.

Mcpeake, S.; Smyth, J. and Ball, H. (2005). Characterisation of Avian Pathogenic Escherichia Coli (Apec) Associated with Colisepticaemia Compared to Faecal Isolates from Healthy Birds. Veterinary Microbiology, 110 (3): 245-253.

Mohamed, M.A.; Shehata, M.A. and Rafeek, E. (2014). Virulence Genes Content and Antimicrobial Resistance in Escherichia Coli from Broiler Chickens. Veterinary Medicine International, 2014 (1): 1-6.

Mohsenifard, E.; Asasi, K.; Sharifiyazdi, H. and Basaki, M. (2016). Phylotyping and Colv Plasmid-Associated Virulence Genotyping of E. Coli Isolated from Broiler Chickens with Colibacillosis in Iran. Comparative Clinical Pathology, 25 (5): 1035-1042.

Nateghi, F.; Jafarpour, M. and Nazemi, A. (2010). A Survey for Detection of Eight Correlated Genes of Avian Pathogenic Escherichia Coli in Human Uropathogenic Escherichia Coli. 3(3): 169-176.

Ngeleka, M.; Brereton, L.; Brown, G. and Fairbrother, J.M. (2002). Pathotypes of Avian Escherichia Coli as Related to Tsh-, Pap-, Pil-, and Iuc-DNA Sequences, and Antibiotic Sensitivity of Isolates from Internal Tissues and the Cloacae of Broilers. Avian Diseases, 46 (1): 143-152.

Ngeleka, M.; Kwaga, J.; White, D.G.; Whittam, T.S.; Riddell, C.; Goodhope, R. et al. (1996). Escherichia Coli Cellulitis in Broiler Chickens: Clonal Relationships among Strains and Analysis of Virulence-Associated Factors of Isolates from Diseased Birds. Infection and immunity, 64 (8): 3118-3126.

Nolan, L.K.; Barnes, H.J.; Vaillancourt, J.P.; Abdul-Aziz, T. and Logue, C.M. Colibacillosis.In: D.E. Swayne, L. Mcdougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez and V. Nair. (2013). Diseases of Poultry. 13th ed. Iowa, USA, John Wiley & Sons, Inc, Pp: 751-805.

Parreira, V.; Arns, C. and Yano, T. (1998). Virulence Factors of Avian Escherichia Coli Associated with Swollen Head Syndrome. Avian Pathology, 27 (2): 148-154.

Peighambari, S.; Vaillancourt, J.P.; Wilson, R. and Gyles, C. (1995). Characteristics of Escherichia Coli Isolates from Avian Cellulitis. Avian Diseases: 39 (1): 116-124.

Pfaff-Mcdonough, S.J.; Horne, S.M.; Giddings, C.W.; Ebert, J.O.; Doetkott, C.; Smith, M.H. et al. (2000). Complement Resistance-Related Traits among Escherichia Coli Isolates from Apparently Healthy Birds and Birds with Colibacillosis. Avian Diseases, 44 (1): 23-33.

Provence, D.L. and Curtiss, R. (1994). Isolation and Characterization of a Gene Involved in Hemagglutination by an Avian Pathogenic Escherichia Coli Strain. Infection and immunity, 62 (4): 1369-1380.

Quinn, P.J.; Carter, M.E.; Markey, B. and Carter, G.R. (1994): Clinical Veterinary Microbiology. 1st ed., Mosby, London, UK, Pp: 209-236.

Rad, M. and Kooshan, M. (2016). A Study on the Presence of Some Potential Virulence Genes and Quinolone Resistance in Avian Pathogenic Escherichia Coli Isolated from Chickens in Northeast of Iran. Iranian Journal of Veterinary Medicine, 9 (4): 271-278.

Rocha, A.C.; Rocha, S.L.; Lima-Rosa, C.A.; Souza, G.F.; Moraes, H.L.; Salle, F.O. et al. (2008). Genes Associated with Pathogenicity of Avian Escherichia Coli (Apec) Isolated from Respiratory Cases of Poultry. Pesquisa Veterinaria Brasileira, 28 (3): 183-186.

www.SID.ir

Archive of SID

Rodriguez-Siek, K.E.; Giddings, C.W.; Doetkott, C.; Johnson, T.J.; Fakhr, M.K. and Nolan, L.K. (2005). Comparison of Escherichia Coli Isolates Implicated in Human Urinary Tract Infection and Avian Colibacillosis. Microbiology, 151 (6): 2097-2110.

Rodriguez-Siek, K.E.; Giddings, C.W.; Doetkott, C.; Johnson, T.J. and Nolan, L.K. (2005). Characterizing the Apec Pathotype. Veterinary Research, 36 (2): 241-256.

Tille, P. (2013). Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. Elsevier Health Sciences, Pp: 307-328.

Tivendale, K.A.; Allen, J.L.; Ginns, C.A.; Crabb, B.S. and Browning, G.F. (2004). Association of Iss and Iuca, but Not Tsh, with Plasmid-Mediated Virulence of Avian Pathogenic Escherichia Coli. Infection and immunity, 72 (11): 6554-6560.

Yazdani, A.; Peighambari, S.; Bidoki, S. and Hosseini, H. (2013). Phenotypic and Genotypic Detection of Aerobactin System among Escherichia Coli Isolates from Cases of Poultry Colibacillosis. Journal of Veterinary Laboratory Research, 5 (2): 77-84.

www.SID.ir

Vol. 14, No. 4, Winter, 2019
Archive of SID

Frequency of *iucD*, *tsh*, and *iss* genes among *Escherichia coli* isolates in broilers infected with colibacillosis

Nikpiran, H.[1]; Peighambari, S.M.[2] and Abdi Khasavan, A.[3]

Received: 13.04.2017 Accepted: 28.10.2017

Abstract

Escherichia coli (*E. coli*) is component of the normal flora of the human intestine, mammals and birds, however, some strains of *E. coli* due to have virulence factors, are pathogenic. The aim of the current study was to determine the frequency of *iucD*, *tsh*, and *iss* genes in broiler flocks infected with colibacillosis in east Azarbaijan-Iran. One Hundred and seventeen *E. coli* isolates from colibacillosis infected broilers with pericarditis, perihepatitis, and air sacculitis investigated. First, standard screening tests and culture was done, and then standard primers and PCR was used for genotype evaluation of isolates in regard of *iucD*, *tsh*, and *iss* genes. In 29 samples (24.78%) all genes (*iucD*, *iss*, and *tsh*) was positive, and 29 (24.78%), 39 (33.33%), and 44 (37.60%) of samples was positive in regard of dual combinations of genes *tsh*/*iss*, *tsh*/*iucD*, and *iss*/*iucD*, respectively. In addition, 34.18%, 37.60%, and 91.45% of isolates possess *tsh*, *iss*, and *iucD*, respectively. Our results indicated which higher percent of evaluated isolates have the ability to produce aerobactin, and the various combination of genes seen in 24.785 to 37.60% of isolates. It seems more investigation needed to the evaluation of virulence factors of east Azarbaijan broilers.

Keywords: *Escherichia coli*, Colibacillosis, *tsh* gene, *iss* gene, *iucD* gene

1- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University Tabriz, Branch, Tabriz, Iran
2- Professor, Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3- Private Veterinarian, Zanjan, Iran
Corresponding Author: Nikpiran, H., E-mail: nikpiran20@iaut.ac.ir

www.SID.ir