



Scan online to view this article

The phylogeny of *Escherichia coli* isolates involved in Colibacillosis and cellulitis in broiler chickens in shahrehabak by Multiplex PCR Technique

Akbar Asadi^{*1}, Taghi Zahraei Salehi², Reza Ghanbarpour³, navid asadi⁴

1. ShahrBabak Branch Islamic Azad University, Shahrehabak, Iran

2. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

3. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar, Kerman, Iran

4. Veterinary student of Bahonar university, kerman, Iran.

Abstract

Aim and Background: *Escherichia coli* infections in poultry have a word wide spread. Serotypes O₁, O₂, O₈, O₃₅, O₇₈ *Escherichia coli* is involved in the development of generalized colibacillosis disease. Genes such as F17, Sfa, pap, afa, , fimH, crl, iuc, bla, yja, chu, are considered as an *Escherichia coli* acuity factor. the aim of the present study were Phylogentic of *Escherichia coli* isolates involved in Colibacillosis and cellulitis in broiler chickens in shahrehabak(Kerman Province) by Multiplex PCR Technique

Material and methods: From 117 samples of *Escherichia coli* (83 colibacillosis samples and 34 cellulitis samples) were isolated. These samples were examined and confirmed by biochemical methods.

Results: *Colibacillosis* isolates were belonged to A (54.27%), B1 (7.22%), B2 (6.03%) and D (32.53%) phylogroups. Where as, the isolates from cellulitis cases were belonged to three main phylogroups; A (55.88%), B1 (5.88%) and D (38.24%).

Conclusion: Statistical analysis showed a specific association between the presence of crl virulence gene and Phylogrups of A and D (P<0.05) in *colibacillosis* isolates. The results showed that the isolates from both diseases in broiler chickens could be assigned to various phylogenetic groups (mainly A). Also, the virulence genes profile of cellulitis *E.coli* is completely different from that of *colibacillosis* in this region..

Key words: *Escherichia coli*, *colibacillosis*, phylogenetic group, cellulitis, virulence genes.

Corresponding author:

ShahrBabak Branch Islamic Azad University, Shahrehabak, Iran

Email: _Dr.asadi44@yahoo.com



برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

فیلوژنی جدایه های /شریشیاکلی مؤثر در موارد کلی باسیلوز و سلولیت طیور گوشتی در شهر بابک به روش Multiplex PCR

اکبر اسدی^{۱*}، تقی زهرایی صالحی^۲، رضا قنبرپور^۳، نوید اسدی^۴

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر بابک، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ایران

۳- گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی دانشکده دامپزشکی شهید باهنر، کرمان، ایران

۴- گروه دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: عفونت های ناشی از /شریشیاکلی در طیور انتشار جهانی دارد. سروتیپ های O₁، O₂، O₈، O₃₅ و O₇₈، /شریشیاکلی در ایجاد بیماری کلی باسیلوز نقش دارند. ژن های مانند *CrL*، *fimH*، *aFa*، *pap*، *SFa*، *F17* و *yja*، *bla*، *aiuc* و *chu* به عنوان فاکتور حدت /شریشیا به شمار می روند. هدف از مطالعه حاضر تعیین فیلوژنی جدایه های /شریشیاکلی دخیل در موارد کلی باسیلوز و سلولیت طیور گوشتی در شهر بابک (استان کرمان) به روش Multiplex PCR بود.

مواد و روش ها: از ۱۱۷ نمونه /شریشیاکلی (۸۳ نمونه کلی باسیلوزی و ۳۴ نمونه سلولیتی) جدا گردید. این نمونه ها به روش های بیوشیمیایی مورد بررسی و تأیید قرار گرفتند.

یافته ها: جدایه های مربوط به موارد کلی باسیلوز متعلق به گروه های فیلوژنی، گروه A (۵۴/۲۷ درصد)، گروه B1 (۷/۲۲ درصد)، گروه B2 (۶/۰۳ درصد) و گروه D (۳۲/۵۳ درصد) بودند. موارد سلولیت جدا شده متعلق به سه گروه اصلی فیلوژنی A (۵۵/۸۸ درصد)، گروه B1 (۵/۸۸ درصد) و گروه D (۳۸/۲۴ درصد) تعلق داشتند.

نتیجه گیری: آنالیز آماری ارتباط ویژه ای بین حضور ژن حدت *crL* و گروه های فیلوژنی A و D را در جدایه های حاصل از کلی باسیلوز نشان داد ($P < 0.05$). نتایج مطالعه نشان داد که جدایه های هر دو بیماری در جوجه های گوشتی می تواند در گروه های فیلوژنی مختلف (به طور عمده A) تقسیم بندی شود. هم چنین پروفایل ژن های حدت در /شریشیاکلی جدا شده از موارد سلولیت با پروفایل موارد کلی باسیلوز در این منطقه کامل متفاوت بود.

واژه های کلیدی: گروه فیلوژنی، /شریشیاکلی، کلی باسیلوز، سلولیت، ژن حدت

مقدمه

عفونت های ناشی از /شریشیاکلی در طیور انتشار جهانی دارند و در اکثر کشورها باعث ایجاد خسارات اقتصادی فراوانی به صنعت طیور می گردد. در سالیان اخیر پیشرفت هایی در زمینه تعیین مکانیسم های بیماری زایی

این باکتری حاصل شده است ولی نقش عوامل حدت به-طور کامل شناخته نشده است. این باکتری فرصت طلب متعلق به خانواده آنتروباکتریاسه بوده و اکثر سویه های آن غیر بیماری زا هستند، سویه های بیماری زا جزء میکروفلور طبیعی دستگاه گوارش بوده و در شرایط استرس محیطی و تضعیف سیستم ایمنی باعث ایجاد بیماری کلی باسیلوز می شوند. حدود ۱۵-۱۰ درصد از کلی فرم های روده مربوط به سروتیپ های بیماری زا هستند. سروتیپ های بیماری زا را همراه با سروتیپ های غیر بیماری زا از محیط اطراف طیور جدا نموده اند (۱،۲).

نویسنده مسئول:

دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر بابک، ایران

پست الکترونیکی: Dr.asadi44@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۲۹

گروه‌ها و تحت گروه‌های فیلوژنی سویه‌های /شریشیاکلی، موارد کلی‌باسیلوز و سلولیت در طیور گوشتی منطقه بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و کشت نمونه‌ها

در یک فاصله زمانی ۶ ماهه در سال ۹۷ از ۱۵ مرغداری موجود در سطح شهرستان شهر بابک تعداد ۱۵۰ نمونه جمع‌آوری و از لاشه‌های غیر گندیده و سالم تعداد ۱۱۷ نمونه /شریشیاکلی (۸۳ نمونه مبتلا به کلی‌باسیلوز و ۳۴ نمونه مبتلا به بیماری سلولیت) جدا گردید. بعد از تقسیم‌بندی نمونه‌ها، از کبد و قلب هر پرنده در محیط مک‌کانکی به روش خطی کشت داده شد. بعد از طی ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد کلنی‌ها رشد نموده و مورد ارزیابی قرار گرفت.

در صورتی‌که در محیط مک‌کانکی کلنی صورتی رنگ مشاهده می‌گردید تشخیص اولیه، /شریشیاکلی بود که جهت تأیید تشخیص یک کلنی خالص برداشته و در محیط‌های TSI، SIM، MR-VP و اوره کشت داده شد. برای تعیین فرمول Imvic از محیط MRVP نیز استفاده گردید. برای ذخیره باکتری از محیط لوری‌برتانی LB استفاده گردید. یک سی‌سی از این محیط داخل میکروتیوب‌های ۲۰۰۰ میکرولیتری ریخته و از کلنی تأیید شده داخل این میکروتیوب‌ها کشت داده شده و بعد از ۲۴ ساعت که باکتری در حرارت ۳۷ درجه رشد نمود، یک سی‌سی گلیسرول ۳۰ درصد به آن‌ها اضافه و ورتکس نموده و تا زمان استفاده در حرارت ۲۰- درجه نگهداری شد.

تأیید نمونه‌های /شریشیاکلی و استخراج DNA

نمونه‌های فریز شده را از فریزر خارج و پس از ذوب در دمای اتاق در محیط جامد لوری‌برتانی کشت داده، سپس از کلنی رشد نموده به میکروتیوب‌های حاوی ۲۵ میکرولیتر سود ۰/۵ نرمال اضافه نموده، ۲۰-۳۰ دقیقه بعد ۲۵ میکرولیتر تریس ۱ مولار اضافه و در نهایت با افزودن ۴۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، حجم محلول را به ۵۰۰ میکرولیتر رسانده که به‌عنوان DNA استخراج شده در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین فیلوتاایپینگ نمونه‌ها آزمایش PCR صورت گرفت برای این منظور ژن‌های *yjaA*، *chuA* و قطعه TSPE4 طبق روش پیشنهادی Clermont و همکاران

سروتیپ‌های *O*₁، *O*₂، *O*₈، *O*₃₅ و *O*₇₈ در بروز بیماری کلی‌باسیلوز و ایجاد عفونت‌های تنفسی و سیستمیک نقش دارند. بیماری‌هایی مثل عفونت کیسه زرده، کلی‌گرانولوما، سلولیت، سینوویت و پری‌تونیت و آنتریت به-وسیله /شریشیاکلی ایجاد می‌شود. فاکتورهای حدتی مانند: *aFa sFa tet Flo bla chu yja SUL*، *Stx aer cat crl PaP FimH* با شدت بیماری و میزان تلفات رابطه مستقیمی دارند. ژن *aFa* و فیمبریه S و P به‌ترتیب به اپرون‌های *aFa sFa PaP E* و مربوط بوده و در چسبندگی باکتری به سلول میزبان و همولیز باکتری نقش دارند. آئروباکتین محصول ژن *iucD* بوده و باکتری را قادر می‌سازد تا در جذب آهن با سلول میزبان به رقابت بپردازد (۳،۴).

/شریشیاکلی به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها مانند کلرامفنیکل، کلرتراسایکلین، نئوماکسین، جنتامایسین، استرپتومایسین، پلی‌میکسین B، انروفلوکساسین و تریمتوپریم حساس بوده، ولی مصرف بی‌رویه دارو باعث بروز مقاومت دارویی می‌شود. در ارزیابی تکامل ژنتیکی /شریشیاکلی، بررسی فیلوژنتیکی اهمیت زیادی دارد که با روش PCR چندگانه و آنزیم الکتروفورزیس صورت می‌گیرد، به‌طوری‌که تعدادی از محققین احتمال می‌دهند برخی ژن‌های /شریشیاکلی پتانسیل ژئوژنتیک بودن دارند (۶،۵). برای بررسی‌های فیلوژنتیکی از حضور ژن‌هایی مثل *yjaA chuA* و همچنین قطعه‌ای از DNA تحت عنوان TSPE4.c استفاده می‌گردد. ارتباط فیلوژنتیکی سویه ECOR (مجموعه سویه‌های رفرانس /شریشیاکلی) نشان می‌دهد که سویه‌های اشریشیا در چهار گروه فیلوژنی A، D، B1، B2 قرار می‌گیرند. به‌منظور افزایش دقت گروه‌بندی فیلوژنی برخی محققین پیشنهاد دادند که هفت تحت گروه فیلوژنی به نام‌های A-1، A-2، B1-1، B2-1، B2-2، D-1، D-2 در /شریشیاکلی تعریف شود (۷). بیش‌تر فراوانی سویه‌های APEC در گروه فیلوژنی A قرار دارند که این فراوانی توسط تعداد زیادی از محققین به اثبات رسیده (۸).

تاکنون هیچ‌گونه مطالعه جامعی در ارتباط با اهمیت عفونت‌های ناشی از باکتری /شریشیاکلی در طیور صنعتی شهرستان شهر بابک صورت نگرفته، لذا هدف از تحقیق حاضر بررسی برخی از ژن‌های حدت و توزیع فراوانی

در سال ۲۰۰۰ مورد آزمایش قرار گرفتند. در این آزمایش از سویه استاندارد ECOR ۶۲ به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (جدول ۱). برای تهیه محلول اصلی آزمایش PCR چندگانه مواد: ۱- آب مقطر ۲- لودینگ

بافر ۳- mgcl2 ۴- dNTP ۵- Taq DNA Polymerase ۶- DNA ۷- سه زوج پرایمر در میکروتیوب های عاری از DNAase با یکدیگر مخلوط گردیدند.

جدول ۱- پرایمرها و سویه های استاندارد به کار رفته در PCR فیلوژنی

منابع	اندازه قطعات (bp)	توالی (5'-3')	پرایمر	ژن
۱۷	۲۷۹	GAC GAA CCA ACG GTC AGG AT	chuA.1	<i>chuA</i>
		TCG CCA GTA CCA AAG ACA	chuA.2	
۲۳	۲۱۱	TGA AGT GTC AGG AGA CGC TG	yajA.1	<i>yajA</i>
		ATG GAG AAT GCG TTC CTC AAC	yajA.2	
۲۳	۱۵۲	GAG TAA TGT CGG GGC ATT CA	TSPE4C2.1	<i>TSP</i>
		CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG	TSPE4C2.2	

آزمایش PCR جهت تعیین فیلوتاایپینگ جدایه ها و الکتروفورز و آنالیز محصولات PCR

محصولات PCR در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردیده و سپس جهت بررسی حضور باندهای مورد نظر ژل های الکتروفورز شده با دستگاه UV مورد بررسی قرار گرفتند و براساس تشکیل باند در جایگاه های خاص، به حضور و عدم حضور ژن های مذکور در سویه پی برده و در پایان به کمک نرم افزار آماری SPSS اطلاعات به دست آمده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون مربع کای و رگرسیون لجستیک استفاده گردید.

نتایج

الف: مرحله جداسازی و تأیید تشخیص
اشریشیاکلی: برای جداسازی اشریشیاکلی از محیط مک کانکی استفاده، که کلنی صورتی رنگ می شود. برای تأیید تشخیص از محیط های TSI، SIM و اوره و برای تعیین فرمول IMVIC (سیمون سیترات، وژپرسکوئر، متیل رد، اندول) از محیط MRVP استفاده گردید. در محیط TSI به علت تولید اسید و گاز وقتی معرف فنلرد اضافه گردید زرد رنگ می شود. در محیط اوره به علت این- که این باکتری آنزیم اوره آز ندارد هیچ گونه تغییر رنگی مشاهده نگردید. در محیط SIM عدم تولید گاز H₂S داریم. در محیط MRVP متیلرد آن مثبت ولی VP زمانیکه معرف باریت اضافه شد منفی بود. و فرمول Imvic به صورت ++ -- است.

ب: نتایج PCR در ارتباط با گروه های فیلوژنی:
 مطابق با جدول ۲ و شکل ۱ گروه های مختلف فیلوژنی به این صورت تعریف می شوند که حضور باند ۱۷۹ نشان- دهنده گروه فیلوژنی D-1، حضور باند ۱۵۱ گروه B1-1، حضور باند ۲۱۱ گروه A-2، حضور باندهای ۲۷۹ و ۲۱۱ همزمان گروه B2-1، حضور همزمان باندهای ۲۷۹ و ۱۵۱ گروه D-2، حضور همزمان باندهای ۲۷۹، ۲۱۱ و ۱۵۱ گروه B2-2، حضور دو باند ۲۱۱ و ۱۵۱ گروه B1 و عدم حضور هر سه باند نشان دهنده گروه فیلوژنی A-1 است.

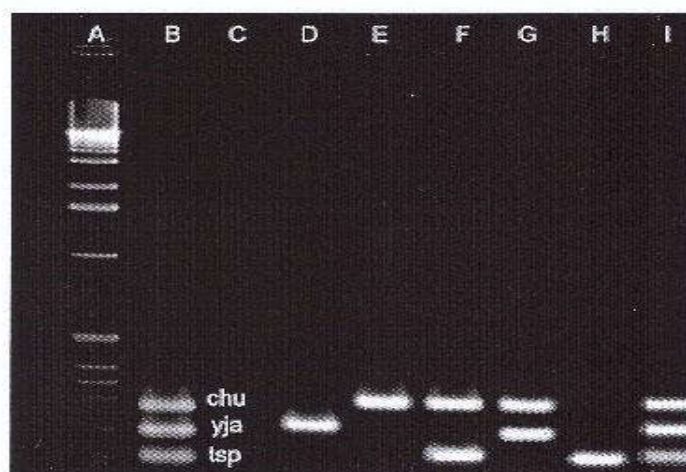
به طور کلی آنالیز فیلوژنی ۱۱۷ جدایه اشریشیاکلی از موارد پاتولوژیک طیور گوشتی نشان می دهد که این جدایه ها در ۴ گروه فیلوژنی قرار گرفتند، ۶۴ جدایه (۵۴/۷ درصد) در گروه A، ۴۰ جدایه (۳۴/۲ درصد) در گروه D، ۸ جدایه (۶/۸ درصد) در گروه B1 و ۵ جدایه (۴/۳ درصد) در گروه B2 قرار داشته و ۴۰ جدایه از این ۱۱۷ جدایه دارای الگوی ژنی *crl.fimH.papc SFa* / *Foc* بوده و اکثر این جدایه ها (۶۷/۵ درصد) متعلق به گروه فیلوژنی A بودند (جدول ۳). از مجموع ۸۳ جدایه کلی باسیلوزی ۵۴/۲۷ درصد متعلق به گروه فیلوژنی A، ۶/۰۳ درصد متعلق به گروه B2، ۳۲/۵۳ درصد متعلق به گروه D و ۷/۲۲ درصد متعلق به گروه B1 بودند و از مجموع ۳۴ جدایه سلولیتی مورد مطالعه ۵۵/۸۸ درصد متعلق به گروه فیلوژنی A، ۳۸/۲۴ درصد متعلق به گروه D، ۵/۸۸

۱/۲ درصد در تحت گروه فیلوژنی D2 قرار داشتند.

در مورد ۳۴ جدایه سلولیت مورد مطالعه تحت گروه فیلوژنی A0 با ۵۰ درصد بیشترین و تحت گروه فیلوژنی B1 با ۵/۹ درصد کمترین مورد را داشتند ضمن آنکه هیچ موردی در تحت گروه B2-2 و B2-3 دیده نشده است.

درصد متعلق به گروه B1 هستند و هیچ کدام در گروه B2 قرار نداشتند.

در مورد تحت گروه های فیلوژنی از ۱۱۷ مورد /شریشیالکی مورد مطالعه ۴۱/۸ درصد در تحت گروه A0، ۶/۸ درصد در تحت گروه A1، ۱۳/۶ درصد در تحت گروه B1، ۳/۷ درصد در تحت گروه B2-2، ۰/۹ درصد در تحت گروه B2-3، ۲۴/۷ درصد در تحت گروه D1، ۸/۵ درصد در تحت گروه فیلوژنی D2 قرار داشتند. (از مجموع ۸۳ جدایه مورد کلی باسیلوزی ۳۸/۳ درصد در تحت گروه فیلوژنی A0، ۷/۲ درصد در تحت گروه A1، ۱۶ درصد در تحت گروه B1، ۴/۸ درصد در تحت گروه B2-2، ۱/۲ درصد در تحت گروه B2-3، ۳۱/۳ درصد در تحت گروه D1 و



شکل ۱- نتیجه آزمایش PCR جهت شناسایی ژن های تعیین کننده گروه فیلوژنی *chu* (۲۷۹ bp)، *yja* (۲۱۱ bp) و *tsp* (۱۵۱ bp). A. لادر ۱ کیلوبازی، B. کنترل مثبت (سویه استاندارد ECORE62). جدایه های مثبت از نظر گروه های فیلوژنی C. تحت گروه فیلوژنی A1، D. تحت گروه A2، E. تحت گروه D1، F. تحت گروه D2، G. تحت گروه B2-1، H. تحت گروه B1-1 و I. تحت گروه B2-2

جدول ۲- گروه های مختلف فیلوژنی

باند	A-۱	A-۱	B۱-۱	B۱-۲	B۲-۱	B۲-۲	D۱	D۲
<i>chu</i> (۲۷۹ bp)	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>yja</i> (۲۱۱)	-	+	-	+	+	+	-	-
<i>tsp</i> (۱۵۱)	-	-	+	+	-	+	-	+

جدول ۳- الگوی ژن های حدت جدا شده در ارتباط با گروه / تحت گروه های فیلوژنی در /شریشیاکلی جدا شده از موارد پاتولوژیک طیور گوشتی

گروه ها و تحت گروه های فیلوژنی	APEC	A		B ₁	B ₂		D		مجموع (%)
		A ₀	A ₁	B ₁	B ₂₋₂	B ₃₋₂	D ₁	D ₂	
الگوهای تشخیص ژنی									
<i>crl fimH papC sfa/foc</i>	کلی باسیلوز	۲۳	۴	۳	-	-	۱۰	-	۴۰ (۳۴/۱۸)
<i>crl fimH sfa/foc</i>	کلی باسیلوز	۳	۳	-	-	-	-	۱	۷ (۵/۹۸)
<i>crl fimH iucD</i>	کلی باسیلوز	۱	۲	-	-	-	-	-	۳ (۲/۵۶)
<i>crl- fimH</i>	کلی باسیلوز	۳	-	۱	۱	-	-	-	۵ (۴/۲۷)
<i>crl- papC</i>	کلی باسیلوز	-	۳	۱	۲	-	۱	-	۷ (۵/۹۸)
<i>fimH-papC</i>	کلی باسیلوز	-	-	-	-	-	۱	-	۱ (۰/۸۵)
<i>fimH-sfa/foc</i>	کلی باسیلوز	۱	-	-	-	-	-	-	۱ (۰/۸۵)
<i>papC-sfa/foc</i>	کلی باسیلوز	۱	۱	۱	۱	۱	-	-	۵ (۴/۲)
<i>fimH</i>	سلولیت	۱۶	-	۲	-	-	-	۳	۲۱ (۱۷/۹)
<i>crl</i>	سلولیت	-	۲	-	-	-	۴	۳	۹ (۷/۶۹)
<i>papC</i>	سلولیت	۱	-	-	-	-	-	-	۱ (۰/۸۵)
غیر قابل تشخیص		-	-	-	-	-	۱۴	۳	۱۷ (۱۴/۵۲)
مجموع تحت گروه		۴۹	۱۵	۸	۴	۱	۳۰	۱۰	۱۱۷
مجموع گروه فیلوژنی		۶۴	-	۸	۵	-	۴۰	-	۱۱۷

بحث

اشریشیاکلی یکی از باکتری های کومنسال روده است که می تواند به عنوان باکتری پاتوژن در طیور بیماری گوارشی و غیر گوارشی ایجاد نماید (۹). کلی باسیلوز در طیور به وسیله سویه های پاتوژن ایجاد می شود و از نظر اقتصادی در صنعت طیور بسیار مهم است (۱۰).

چندین گزارش نیز وجود دارد که براساس یافته های عوامل حدت و فیلوژنی، سویه های اشریشیاکلی بیماری زا را در طیور عواملی معرفی می کند که پتانسیل زئونوتیک دارد. نقش عوامل حدت در پاتوژن سویه های بیماری زای اشریشیاکلی APEC هنوز به طور کامل مشخص نشده گرچه در سال های اخیر پیشرفت های زیادی در این زمینه حاصل شده است (۱۱).

چندین آدزین فیمبریه ای و غیر فیمبریه ای در سویه های APEC شناسایی شده است که مهم ترین آن ها فیمبریه p و fl است. فیمبریه fl که به وسیله اپرون (fim) کد می شود در مراحل اولیه عفونت اشریشیاکلی نقش بازی کرده و موجب

کلنیزه شدن باکتری در سطوح اپی تلایال سلول های ریه، کیسه های هوایی و نای می گردد، در حالی که فیمبریه p به وسیله ژن (pap) کد می شود که در سایر مراحل ایجاد عفونت به وسیله این باکتری نقش خود را ایفا می کند (۱۲، ۱۳). در سویه های APEC فیمبریه s به وسیله ژن (sfa) کد می شود که شامل دسته ای از آدزین های فیمبریه ای است (۱۴). عوامل غیر فیمبریه ای تحت عنوان آدزین های afa نامیده می شوند در سویه های APEC شناسایی شده اند (۱۵). آئروباکتین که به عنوان مکانیسم کسب آهن در اکثر سویه های اشریشیاکلی گزارش شده است به وسیله دسته ژنی (iucD) کد می شود (۱۶).

باتوجه به این که سویه های محیطی و مدفوعی اشریشیاکلی که از طیور جدا شده اند دارای برخی ژن های حدت یاد شده در بالا هستند به نظر می رسد شناسایی سویه های پاتوژن از سویه های غیر پاتوژن نیازمند مطالعه های دیگری است. در این ارتباط آنالیز فیلوژنتیکی سویه های اشریشیاکلی از اهمیت ویژه ای برخوردار می شود (۱۷). براساس یافته های فیلوژنتیکی سویه های اشریشیاکلی را می توان در ۴ گروه A،

(۱۸٪/۶۵) بوده (۲۲). از سویه‌های APEC جدا شده از نواحی جغرافیایی مختلف فراوانی ژن‌های حدت از جمله آئروباکتین را بین ۲۳ تا ۸۰ درصد گزارش نموده‌اند (۲۳).

از مجموع ۱۱۷ جدایه، ۴۰ جدایه (۳۴/۱۸ درصد) دارای الگوی ژنی *crl fimH papC sfa/foc* بودند که بیش‌ترین فراوانی در بین الگوهای ژنی مربوط به این الگو بود و اکثر این جدایه‌ها (۶۷/۵ درصد) متعلق به گروه فیلوژنی A بودند (جدول ۲).

براساس مطالعه‌های انجام شده انتقال ژن‌های حدت امکان دارد به صورت افقی در بین سویه‌های /شریشیالکی انجام گیرد و دلیل انتشار ژن‌های حدت در گروه‌های فیلوژنتیکی کسب این ژن‌ها به صورت افقی از سایر سویه‌های /شریشیالکی است که در نهایت منجر به ایجاد تنوع ژنتیکی سویه‌های APEC از نظر گروه‌های فیلوژنتیکی و ژن‌های حدت می‌گردد گرچه علاوه بر انتقال افقی، موتاسیون هم در ایجاد این تنوع ژنتیکی دخالت دارد (۲۴). نکته‌ای که هنوز در مورد کسب ژن حدت بی‌پاسخ مانده است این است که آیا صرف قابلیت بیماری‌زایی و حدت را در باکتری دریافت کننده افزایش می‌دهد یا علاوه بر دریافت ژن حدت سایر عوامل زمینه‌ای نیز در مورد این ژن مؤثراند (۲۵).

حضور درصد بالای ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های /شریشیالکی از موارد پاتولوژیک در این منطقه نشان‌دهنده این است که این جدایه‌ها می‌توانند منبع انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشند. مکانیسم انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی از جدایه‌های حیوانی به انسان هنوز به درستی شناخته نشده است (۲۶).

نتیجه‌گیری

جدایه‌های /شریشیالکی جدا شده در منطقه به طور عمده در گروه فیلوژنی A قرار گرفتند که این جدایه با درصد بالای دارای ژن‌های حدت فیمبریه‌ای بودند. پروفایل الگوهای ژنی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشاهده شده در موارد کلی‌باسلیوز با موارد سلولیت به طور کامل متفاوت بود. نتیجه تحقیق این است که اگر شباهت ژنومی در جدایه‌ها داشته باشیم نشانه شرایط نامساعد و ضعف مدیریتی مشابه در مرغداری‌ها بوده و برای از بین بردن جدایه‌ها باید روش مناسب اتخاذ نمود و اگر گونه جدیدی در منطقه وجود داشته باشد باید راهکار مناسبی برای مقابله با آن پیدا نمود. حضور و شیوع این بیماری‌ها با وجود درمان‌های آنتی‌بیوتیکی ارتباط زیادی با

B₁, B₂ و D تقسیم‌بندی نمود. به نظر می‌رسد سویه‌های /شریشیالکی بیماری‌زای خارج گوارشی EXPEC به طور عمده متعلق به گروه B₂ هستند و به مقدار کمی به گروه D متعلق‌اند. درحالی‌که اکثر سویه‌های کومنسال انسانی متعلق به گروه A هستند. آنچه مسلم است ۴ گروه فیلوژنتیکی ذکر شده از نظر ویژگی‌های اکولوژیکی تاریخچه بیولوژیکی و قابلیت بیماری‌زایی متفاوت هستند (۱۹، ۱۸).

هدف از این بررسی تعیین ژن‌های حدت گروه‌ها و تحت گروه‌های فیلوژنتیکی در سویه‌های /شریشیالکی جدا شده از موارد پاتولوژیک طیور در منطقه شهر بابک بوده است. همان‌گونه که در بخش نتایج نشان داده شده است سویه‌های APEC در این بررسی در هر ۴ گروه فیلوژنتیکی A، B₁، B₂ و D انتشار دارند که بیش‌ترین فراوانی متعلق به گروه A (۴۸٪)، گروه D (۳۰٪)، گروه B₁ (۱۷٪) و گروه B₂ (۵٪). علاوه بر این جدایه‌های مورد بررسی از نظر تحت گروه فیلوژنتیکی نیز در گروه‌های B₂-1، D₁، D₂، B₂-2، A₁، A₂، B₁-1، 2 قرار گرفتند.

به طور کلی، آنالیز فیلوژنی ۱۱۷ جدایه /شریشیالکی از موارد پاتولوژیک جوجه‌های گوشتی نشان داد که این جدایه‌ها در چهار گروه فیلوژنی قرار دارند. تعداد ۶۴ جدایه (۵۴/۷ درصد) در گروه A، ۴۰ جدایه (۳۴/۱۸ درصد) در گروه D، ۸ جدایه (۶/۸۳ درصد) در گروه B₁ و ۵ جدایه (۴/۲۷ درصد) در گروه فیلوژنی B₂ قرار گرفتند (۲۰).

مطالعه مشابهی که توسط Rodriguez و همکاران در سال ۲۰۰۵ انجام شده نشان می‌دهد سویه‌های APEC متعلق به ۴ گروه A (۳۸٪)، D (۱٪/۲۸)، B₁ (۱۸٪/۵)، B₂ (۱۵٪/۵) بوده است که از نظر فراوانی کمابیش با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. بررسی مقایسه‌ای انتشار فیلوژنتیکی سویه‌های EXPEC جدا شده از انسان با سویه‌های APEC جدا شده از طیور نشان می‌دهد که سویه‌های EXPEC انسانی به طور عمده در گروه B₂ و سپس D قرار دارند در حالی‌که سویه‌های طیوری به طور غالب در گروه A انتشار دارند (۲۱).

مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۸ توسط Dissanayake و همکاران جهت تعیین تفاوت‌های فیلوژنتیکی سویه‌های APEC و سویه‌های غیر بیماری‌زای مدفوعی طیور انجام شده است نشان می‌دهد که سویه‌های APEC به ترتیب متعلق به گروه‌های A (۷۱٪)، B₁ (۴٪/۱)، B₂ (۷٪/۹)، D

مسائل مدیریتی و بهداشتی دارد. به طور کلی این گونه تحقیقات کمک به شناسایی گونه های جدید، بررسی شباهت ها و تفاوت های سویه ها، صرفه جویی در هزینه ها، چگونگی انتقال و تکثیر زن ها و عوامل مؤثر در بروز جهش در ژنوم باکتری می نماید.

- 1- Akond MA, Alam S, Hassan SMR, Shirin M. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. *Internet Journal of food safety*; 2015. 11: 19-23ce
- 2- Dissanayake DR, Wijewardana TG, Gunawardena GA, Poxton IR. Distribution of lipopolysaccharide core types among avian pathogenic *Escherichia coli* in relation to the major phylogenetic groups. *Vet Microbiol*; 2008. 132: 355-363.
- 3- Escobar-Paramo P, Clermont O, Blanc-Potard AB, Bui H, Bouguenec Cle, Denamur E. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol*; 2012. 41: 1085-1094.
- 4- Bernard D, Renato D, Herman EN, Ginsberg H. *Microbiology*. 7th Ed. Lippincott; 2014. 93:27-35.
- 5-Caza MF, Lepine SM, Dozois CM. Specific roles of the *iroBC* DEN genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production of salmochelins. *Infect Immun*; 2011. 87:3539-3549.
- 6-Chouikha I, Bree A, Moulin-Schouleur M, Gilot P, Germon P. Differential expression of *iutA* and *ibeA* in the early stages of infection by extra-intestinal pathogenic *E. coli*. *Microbes Infect*; 2017. 18:432-438.
- 7- Delicato ER, de Brito BG, Gaziri LC, Vidotto MC. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet Microbiol*; 2013. 94: 97-103.
- 8- Jeffeyies R, Kuskowski MA, Gajewski A, Soto S, Horcajada JP, Jimenez de Anta MT, Vila J. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J Infect Dis*; 2013. 191: 46-50.
- 9- Mohsenifard E, et al. phylogenic and coiv plasmid associaited virulence genecity of *E.coli* isolated from broiler chickness with colibacillosis in iran comclinpatho; 2016. 25:1035-1041
- 10- Clermont P, Girardeau J, Darfeuille-Michaud A, Contrepolis M. Characterization of k2 fimbria, a new adhesion of septicaemic and diarrhea – associated *Escherichia coli* strains, that belongs to a family of adhesions with N-acetyl-D-glucosamine recognition. *Infection and Immunity*; 2010. 66 (3): 4555-4558.
- 11- Johnson JR, Delavari P, Kuskowski M, Stell AL. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*; 2017. 183(1): 78-88
- 12- Stordeur P, Bree A, Mainil J, Moulin-Schouleur M. Pathogenicity of pap-negative avian *Escherichia coli* isolated from septicaemic lesions. *Microbes Infect*; 2008. 6: 637-645.
- 13- Tivendale KA, Noormohammadi AH, Allen JL, Browning GF. The conserved portion of the putative virulence region contributes to virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*; 2009. 155:450-460.
- 14- Willking N, acquemin J, Oswald E, mainil E. Multiplex PCRs for indentification of necrotoxigenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology*; 2014. 67(9): 4480-4482.
- 15- Vandekerchove D, Vandemaele FC, Adriaensen M, Zaleska JP, Hernalsteens L, De Baets P, Butaye F, Van Immerseel P, Wattiau H, Laevens J, Mast B, Goddeeris B, Pasmans F. Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. *Vet Microbiol*; 2015. 123: 75-87.
- 16- Gordon DM, Clermont O, Tolley H, Denamur E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol*; 2017. 16: 2484-2496.

- 17- Khan KA, Khan SA, Aslam A, Rabbani M, Tipu MY. Factors contributing to yolk retention in poultry: a review. *Pakistan Veterinary Journal*; 2014. 24 (1): 46–5
- 18- Gomis SM, Gomis AI, Horadagoda NU, et al. Studies on cellulitis and other disease syndromes caused by *Escherichia coli* in broilers in Sri Lanka. *Trop Anim Health Prod*; 2011. 32:341-351
19. Skurnik D, Ruimy R, Andremont A, Amorin C, Rouquet P, Picard B, Denamur E. Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 2017. 57(6): 1215-1219
20. Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 2017. 90(10): 4384-4388
- 21- Elphinstone JG. The current bacterial wilt situation: a global overview. Pages 9-28 in: *Bacterial Wilt: The Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. Allen C, Prior P, Hayward AC, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN; 2014.
- 22- Zuleske TL, Grant EC, Inendino KR, Kassler TW, Claussen JE, Phillip DP. Increased infectious disease susceptibility resulting from outbreeding depression. *Conservation Biology*; 2018. 19:455-462.
- 23- Stehling EG, Campos TA, Azevedo V, Brocchi M, Silveira WD. DNA sequencing of a pathogenicity-related plasmid of an avian septicemic *Escherichia coli* strain. *Genet Mol Res*; 2014. 6: 231-237.
- 24- Drid SN, Raver EE, Gussakovsky M, Derouet M, Picard A, Gertler M, Taouis M. Biological activities of recombinant chicken leptin C4S analog compared with unmodified leptins. *Am Journal of Physiology*; 2018. 279: 116-123.
- 25- Ghanbarpour R. genetic analysis of virulence genes antimicrobial profile of diarrhea agenic *Escherichia coli* isolated from disease poultry in Iran. *Trop Anim Health Prod*; 2017. DOI 10.1007/s 11250-017-1234-7
- 26- Mokadya T, Murray PR, Kobayashi GS, Pfaller MA, Rosenthal Ken S. *Medical Microbiology* 6th Ed., International edition; 2010. 295(6-7):455-462.
- 27- scobar-Páramo P, Menac'h L, Gall T, Amorin, C, Gouriou, S, Picard B, Denamur E. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environmental microbiology*; 2016. 8(11): 1975-1984.
- 28- Salehi M, Ghanbarpour R. Phenotypic and genotypic properties of *Escherichia coli* isolated from colisepticemic cases of Japanese quail. *Tropical Animal Health and Production*; 2017. 42(7): 1497-1504.
- 29- Zhu SY, Lu H, Wang J. [Isolation of avian *Escherichia coli* and PCR detection of their F1 and HPI genes]. *Wei Sheng Wu Xue Bao*; 2017. 83:795-799.