

## مطالعه ژنوتیپی و فنوتیپی سیستم آئروباکتین در جدایه های اشریشیا کولای از موارد کلی باسیلوز طیور

یزدانی، ا.، پیغمبری، س.م.، بیدکی، س.ک.، حسینی، ح.۴.

دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۰۷ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۰۹

### خلاصه

اهداف این تحقیق بررسی فراوانی توانایی تولید آئروباکتین و حضور یکی از ژن های دخیل در بیوسنتز سیستم آئروباکتین (*iucD*) در جدایه های اشریشیا کولای (*Escherichia coli*) از موارد کلی باسیلوز طیور بودند. به همین منظور تعداد ۵۰ جدایه اشریشیا کولای از جراحات پریکاردیت جوجه های گوشتی تلف شده از بیماری کلی باسیلوز از مرغداری های گوشتی در استان های تهران، البرز، و قزوین جمع آوری شدند و از نظر توانایی تولید آئروباکتین و حضور ژن *iucD* مورد آزمایش قرار گرفتند. در بررسی فنوتیپی، توانایی تولید آئروباکتین توسط ۵۰ جدایه اشریشیا کولای مورد مطالعه بر اساس روش های تشریح شده قبلی تعیین شدند. در بررسی ژنوتیپی، از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) به عنوان روش مولکولی برای شناسایی ژن *iucD* استفاده شد. نتایج آزمایشات فنوتیپی نشان داد که در بین جدایه های اشریشیا کولای، ۸۶٪ توانایی تولید آئروباکتین را داشتند. در آزمایش PCR، در ۹۶٪ جدایه ها حضور ژن *iucD* مورد تأیید قرار گرفت ولی در دو جدایه که از نظر فنوتیپی نیز منفی بودند، ژن آئروباکتین شناسائی نشد. یافته های پژوهش حاضر نشان داد که درصد بالائی از جدایه های اشریشیا کولای بیماری زای طیور قادر به تولید آئروباکتین می باشند که با توجه به مطالعات مشابه سایر پژوهشگران به ویژه بررسی های مقایسه ای با جدایه های اشریشیا کولای به دست آمده از مرغان به ظاهر سالم، وجود یک ارتباط قوی بین تولید آئروباکتین و میزان حدت در سویه های اشریشیا کولای طیور را می توان مورد تأکید قرار داد.

**واژه های کلیدی:** اشریشیا کولای، کلی باسیلوز، طیور، آئروباکتین، ژن *iucD*، ایران.

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، واحد تهران، تهران، ایران.
۲. گروه بیماری های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳. گروه ژنتیک و بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، واحد تهران، تهران، ایران.
۴. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران.

\*نویسنده مسؤول: mpeigham@ut.ac.ir

همکاران، ۲۰۰۳؛ Oh و همکاران، ۲۰۱۲؛ Ananias و Yano، ۲۰۰۸). در ایران، وجود سیستم آئروباکتین در مطالعه قبلی ما در ۸۵٪ جدایه های *اشریشیا کولای* از موارد کلی باسیلوز طیور گوشتی از نظر فنوتیپی مورد تأیید قرار گرفت (خوشخو و پیغمبری، ۱۳۸۳). در پژوهش حاضر، فراوانی تولید آئروباکتین از نظر فنوتیپی بر روی محیط کشت میکروبی و حضور یکی از ژن های دخیل در بیوسنتز سیستم آئروباکتین (*iucD*) با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) در جدایه های *اشریشیا کولای* بدست آمده از موارد کلی باسیلوز طیور در مرغداری های گوشتی استان های تهران، البرز، و قزوین در سال های اخیر مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش کار

#### نمونه برداری و جداسازی *اشریشیا کولای*

جدایه های *اشریشیا کولای* از گنجه میکروبی کلینیک طیور وابسته به دانشگاه انتخاب شدند. این جدایه ها از تلفات کلی باسیلوزی ۱۰ واحد صنعتی پرورش جوجه گوشتی جمع آوری شده بودند. به طور خلاصه، اساس نمونه برداری به این صورت بود که هنگام کالبدگشایی پنج قلب مبتلا به ضایعه پریکار دیت از بین مجموع تلفات هر مرغداری در داخل پتری دیش استریل جمع آوری و به منظور کشت باکتریایی به آزمایشگاه انتقال یافتند. به این ترتیب، تعداد ۵۰ نمونه (۵ نمونه از هر مرغداری) جمع آوری شدند. در آزمایشگاه، بر اساس روش های استاندارد باکتری شناسی، از خون هر قلب نمونه برداری شد و بر روی محیط مکنانکی آگار کشت خطی داده شد (Quinn و همکاران، ۱۹۹۴؛ Lee و Arp، ۱۹۹۸). پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. سپس، یک کلنی صاف لاکتوز مثبت *اشریشیا کولای* از هر پلیت که از نظر مورفولوژی غالب بود، برداشت شد. تایید قطعی هویت *اشریشیا کولای* توسط روش های استاندارد بیوشیمیایی صورت گرفت (Baron و Finegold، ۱۹۹۰). در صورت مشاهده ویژگی های شکلی مربوط به *اشریشیا کولای* در محیط مک کانکی آگار، جدایه موجود با بهره گیری از محیط های گوناگون بیوشیمیایی مانند آگار سه قندی (TSI)، اوره، متیل رد، وژس پروسکوئر، سیترات و SIM مورد تأیید قطعی قرار می گرفت. جدایه های تأیید شده پس از خالص شدن، در محیط آبگوشت مغذی کشت داده شدند و سپس برای استفاده های بعدی همراه با گلیسرول ۵۰ درصد در فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. کلیه محیط های کشت میکروبی و بیوشیمیایی مورد استفاده از مرک آلمان بودند.

*اشریشیا کولای* بیماری زای پرندگان جزء سویه های *اشریشیا کولای* بیماری زای خارج روده ای می باشند و باعث ایجاد بیماری - های مختلفی در طیور می شوند. از جمله این بیماری ها، کلی باسیلوز، سلولیت، سندرم کله بادی، عفونت کیسه زرده، کلی گرانوما و تورم ملتحمه چشم و تورم چشم می باشند (Barnes و همکاران، ۲۰۰۸). *اشریشیا کولای* بیشترین فراوانی را در جدایه های باکتریایی بدست آمده از سلولیت طیور دارد (Peighambari و همکاران، ۱۹۹۵؛ Singer و همکاران، ۲۰۰۰). جدایه های *اشریشیا کولای* جراحات سلولیت پرندگان از نظر فاکتورهای حدت شبیه به جدایه های *اشریشیا کولای* دیگر جراحات کلی باسیلوز است (Peighambari و همکاران، ۱۹۹۵؛ de Britoet و همکاران، ۲۰۰۳). مکانیسم بیماری زایی جدایه های بیماری زای *اشریشیا کولای* پرندگان هنوز به طور کامل شناخته نشده است (Johnson و همکاران، ۲۰۰۶). در حال حاضر روشن شده است که برخی از سویه های *اشریشیا کولای* به واسطه بهره مندی از برخی عوامل حدت، بیماری زایی بیشتری دارند. در طی سه دهه اخیر مطالعات گسترده ای به منظور شناسایی این عوامل و نقش آنها در بیماری زایی عفونت های حاصل از *اشریشیا کولای* طیور و سایر حیوانات انجام شده است.

یکی از معمول ترین راهبردهای مکمل در میکروارگانیزم ها با توجه به پایین بودن آهن آزاد و قابل دسترس در بافت ها و مایعات بدن، تولید سیدروفور هاست. این مولکول ها مواد شلاته کننده آهن با وزن مولکولی پایین و میل ترکیبی بالا هستند که در باکتری های مهاجم به منظور مقابله و رقابت با حامل های فیزیولوژیک آهن در بدن انسان و حیوانات مانند ترانسفرین و لاکتوفرین و فریتین (آهن داخل سلولی) شکل گرفته اند (Martinez و همکاران، ۱۹۸۹). بنابراین سیدروفورها به عنوان عوامل جذب کننده آهن خارج سلولی از مواد معدنی یا ترکیبات آلی در شرایط فقدان آهن عمل می کنند. یکی از مهمترین سیدروفورهای شناسائی شده در *اشریشیا کولای*، سیستم آئروباکتین می باشد. بیوسنتز آئروباکتین بوسیله آنزیم های کدگذاری شده توسط ژن های *iucA*، *iucB*، *iucC* و *iucD* پیش می رود و جذب آئروباکتین به داخل پری پلاسم بوسیله پروتئین گیرنده غشاء خارجی ویژه ای انجام می شود. جذب کمپلکس فریک-آئروباکتین بوسیله رستپور Iuta غشای خارجی انجام می شود (de Lorenzo و Neilands، ۱۹۸۶). وجود سیستم آئروباکتین در جدایه های *اشریشیا کولای* از موارد بیماری در انسان و دام و طیور در پژوهش های بسیاری که در خصوص تعیین عوامل حدت *اشریشیا کولای* صورت گرفته است، مورد تأیید قرار گرفته است (Peighambari و همکاران، ۱۹۹۵؛ Gomis و همکاران، ۲۰۰۰؛ de Britoet و

## توانایی تولید آئروباکتین

تعیین تولید آئروباکتین جدایه‌ها براساس روش‌های تشریح شده در مطالعات قبل (Peighambari و همکاران، ۱۹۹۵) انجام شد. تعداد سه سویه/اشریشیا کولای استاندارد که برای انجام این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند، عبارت بودند از: سویه اندیکاتور LG 1522 (*E. coli* K-12)، سویه/اشریشیا کولای VW187 (کنترل مثبت، تولید کننده آئروباکتین) و سویه/اشریشیا کولای RS 218 (کنترل منفی، فاقد سیستم تولید آئروباکتین). سویه اندیکاتور به محیط مایع CM9 (نحوه آماده سازی این محیط در انتهای پاراگراف شرح داده شده است) انتقال داده شد و محیط کشت حاصله پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد و رسیدن به غلظت مناسب ( $\text{Optical density} = 0.54 - 0.56$ )، سانتیفریوژ، شستشو در محیط M9 Minimal Salts (Sigma, USA) و رقیق‌سازی‌های مناسب، با آگاروز ذوب شده حاوی دایپیریدیل (سیگما) مخلوط و سریعاً بر روی پلیت‌های CM9 آگار حاوی دای-پیریدیل بطور یکنواخت اضافه شد. پس از سفت شدن آگار، سویه‌های کنترل به همراه پنج جدایه/اشریشیا کولای مورد آزمایش که روز قبل بر روی محیط مک کانکی رشد داده شده بوده، بر روی هر پلیت CM9 آگار به صورت نقطه‌ای کشت شدند و پس از ۱۲ ساعت نگهداری در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد مورد مشاهده قرار گرفتند. تشکیل هاله‌ای از رشد سویه اندیکاتور اطراف هر کشت نقطه‌ای به مفهوم تولید آئروباکتین به وسیله جدایه مورد آزمایش محسوب شد. شایان ذکر است که هر لیتر محیط مایع CM9 با افزودن ۱۰ میلی لیتر گلوکز ۵۰٪، ۱۰ میلی لیتر کازامینوآسید ۲۰٪ (Difco, USA)، ۴ میلی لیتر تیمین (0.5 mg/ml)، یک میلی لیتر از محلول کلراید کلسیم (0.01 M) - سولفات منیزیم (0.1 M)، و ۵ میلی لیتر تربیتوفان (4 mg/ml) به ۹۷۰ میلی لیتر محیط M9 Minimal Salts تهیه شد. همه مواد مورد استفاده به جز مواردی که ذکر شده است، از مرک آلمان بودند.

## آزمایش PCR

جهت استخراج DNA باکتری‌ها، ابتدا همه نمونه‌ها در محیط مایع LB (Luria-Bertani) کشت و به مدت یک شب در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس یک میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی هر باکتری را داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری جداگانه ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت  $10000 \times g$  سانتیفریوژ (Sigma 1-14) شدند. پس از دور ریختن مایع رویی، نمونه‌ها در ۳۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل با ورتکس مخلوط، به مدت ۱۰ دقیقه

جوشانده، و سپس بلافاصله در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شدند. مجدداً، کلیه میکروتیوب‌ها به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ شدند. مایع رویی به یک میکروتیوب جدید منتقل شد و به عنوان DNA باکتری برای مراحل بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در واکنش PCR، حضور ژن *iucD* که کد کننده *iucD* مونواکسیژناز می‌باشد با کمک دو پرایمر که توالی آنها در جدول شماره ۱ ذکر شده است (Franck و همکاران، ۱۹۹۸)، مورد جستجو قرار گرفت. پرایمرها و کلیه مواد واکنش از شرکت سیناکلون (تهران، ایران) تهیه شدند. تمام واکنش‌ها در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. مقدار ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده به محلول مخلوط مادر (Mastermix) برای هر واکنش PCR شامل ۰/۵ میکرولیتر مخلوطی از دو پرایمر که شامل ۲۵ میکرومول از هر پرایمر بود، ۰/۸ میکرولیتر  $MgCl_2$  ۵۰ میلی مول، یک میکرولیتر dNTPs ۱/۲۵ میلی مول، ۰/۲ میکرولیتر (یک واحد) آنزیم *Taq DNA polymerase*، ۲ میکرولیتر بافر 10x PCR و ۱۳/۵ میکرولیتر آب دیونیزه، افزوده شد. نمونه‌های کنترل مثبت (سویه/اشریشیا کولای VW187 تولید کننده آئروباکتین) و کنترل منفی (سویه/اشریشیا کولای RS 218 فاقد سیستم تولید آئروباکتین) در هر واکنش در نظر گرفته شدند. برای تکثیر فراورده PCR به طول ۷۱۴ جفت باز، برنامه تکثیر در ترموسایکلر (CG palm-cycler, CG 1-96, Germany) بدین شرح انجام شد: ۳۰ سیکل شامل مرحله واسرشت سازی به مدت ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد، اتصال پرایمر به مدت ۳۰ ثانیه در ۵۰ درجه سانتیگراد، امتداد به مدت ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد، و در آخر تکثیر نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد (Franck و همکاران، ۱۹۹۸). فراورده‌های PCR در یخچال ۴ درجه سانتی گراد تا زمان ژل الکتروفورز نگهداری شدند. برای انجام ژل الکتروفورز از روش توصیه شده Sambrook و Russell (۲۰۰۱) استفاده شد.

این روش با استفاده از آگاروز ۲ درصد حل شده در 0.5 x TBE (8.9 M TRIS, 8.9 M Boric acid, 0.2 M EDTA) انجام گرفت. مخلوط ۶ میکرولیتر از فراورده PCR هر نمونه مورد بررسی با ۲ میکرولیتر ۶x Gel-loading buffer (سینازن) به داخل هر گوده ژل افزوده شد. جهت تعیین وزن ملکولی باندهای مشاهده شده بر روی هر ژل از مارکر تجاری 1 O'GeneRuler™ (kb DNA Ladder (Fermentas, Germany) استفاده شد. نحوه آماده سازی مارکر تجاری براساس توصیه کارخانه سازنده صورت گرفت. با استفاده از دستگاه ژل الکتروفورز (فناوران سهند

آذر، ایران) و بافر 0.5 x TBE جریان‌ی به ظرفیت ۱۰۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه از ژل عبور داده شد. سپس ژل به مدت ۲۰ دقیقه در ظرف حاوی محلول اتیدیوم بروماید (10 mg/ml) (سیناژن) جهت رنگ‌آمیزی و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در ظرف حاوی آب مقطر جهت شستشو قرار داده شد. باندهای DNA روی ژل، بلافاصله با

استفاده از نور ماوراء بنفش ترانس ایلومیناتور و دوربین عکسبرداری از ژل شرکت ویلبرلورمت (Vilber-Lourmat ECX-F15-M, France) مشاهده و تصویربرداری شدند. محاسبه وزن ملکولی باندها با استفاده از نرم‌افزار کامپیوتری Seqaid II, ver. 3.5 (Kansas State University) صورت پذیرفت.

Gene	Primer sequence (5'-3')	Localization within gene	GenBank Acc. no	Size (bp)
<i>iucD</i>	DF: ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC	239-259	<i>M18968</i>	714
	DR: CCTGATCCAGATGATGCT	۹۵۲-۹۳۴		

جدول ۱. خصوصیات پرایمرها و اندازه محصول PCR

## نتایج

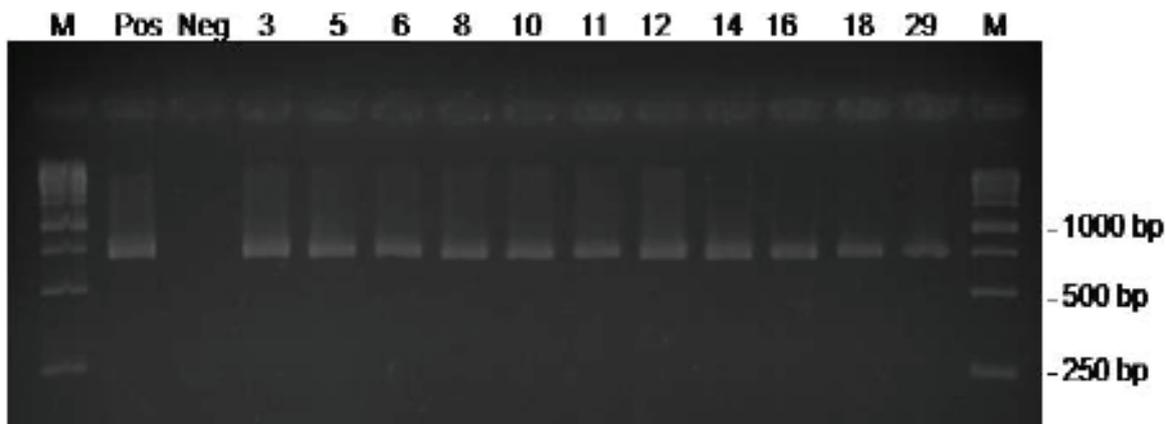
بررسی فنوتیپی سیستم آئروباکتین در مورد تمام جدایه‌های *اشریشیا کولای* نشان داد که ۸۶ درصد جدایه‌ها (۴۳ جدایه) دارای توانایی تولید آئروباکتین و ۷ جدایه فاقد توانایی تولید آئروباکتین در محیط برون تن (*in vitro*) بودند. در بررسی ژنوتیپی آئروباکتین با روش PCR، ژن *iucD* در تمام نمونه‌ها به استثناء ۲ نمونه که از نظر فنوتیپ نیز منفی بودند، شناسایی شد (شکل ۱).

در تحقیقات سایر پژوهشگران مشخص شده است که اختلاف چشمگیری در تولید آئروباکتین به وسیله جدایه‌های *اشریشیا کولای* بیماری‌زای طیور در مقایسه با جدایه‌های *اشریشیا کولای* حاصله از طیور سالم وجود دارد. در مطالعات Dozois و همکاران (۲۰۰۳)، Peighambari و همکاران (۱۹۹۵)، Ngeleka و همکاران (۱۹۹۶)، و Parreira و همکاران (۱۹۹۸)، به ترتیب ۹۸، ۹۰، ۸۲ و ۵۶ درصد جدایه‌های *اشریشیا کولای* بدست آمده از نمونه‌های بیماری تولیدکننده آئروباکتین بودند. در حالی که در مطالعات Dozois و همکاران (۲۰۰۳) و Peighambari و همکاران (۱۹۹۵) به ترتیب تنها در ۳۱ و ۱۶ درصد جدایه‌های *اشریشیا کولای* جدا شده از جوجه‌های سالم توانایی تولید آئروباکتین وجود داشت که از نظر آماری اختلاف معنی داری را نشان دادند. در بررسی دیگری Jeffery و همکاران (۲۰۰۲) ملاحظه نمودند که به ترتیب ۸۶ و ۹۲ درصد جدایه‌های *اشریشیا کولای* کلی‌سپتیمی و جدایه‌های *اشریشیا کولای* سلولیت طیور توانایی تولید آئروباکتین را داشتند. حقیقی خوشخو و پیغمبری (۱۳۸۳)، در بررسی جامعی که بر روی خصوصیات ۱۰۰ جدایه *اشریشیا کولای* کلی‌باسیلوز طیور انجام دادند، پی بردند که ۸۵ درصد جدایه‌ها توانایی تولید آئروباکتین را داشتند. وجود درصد بالایی (۸۶٪) از *اشریشیا کولای* بیماری‌زای طیور که تولیدکننده آئروباکتین بودند در مطالعه حاضر با پژوهش‌های مشابه قبلی همخوانی دارد.

در سالهای اخیر پژوهش‌ها بیشتر جنبه ملکولی پیدا کرده است و شناسایی ژن‌های مختلف آئروباکتین مورد توجه قرار گرفته است. در بعضی از این بررسی‌ها، فراوانی ژن‌های آئروباکتین بین ۴۴ تا ۸۳

## بحث

*اشریشیا کولای* بیماری‌زای پرندگان موجب بروز بیماری‌های گوناگونی در طیور می‌شود و سالیانه خسارات زیادی به صنعت طیور در سراسر جهان وارد می‌کند. تحقیقات بسیاری در رابطه با تعیین عوامل حدت از جمله آئروباکتین و همچنین تعیین حدت جدایه‌های مختلف *اشریشیا کولای* در طیور و پستانداران از جمله انسان انجام شده است (Peighambari و همکاران، ۱۹۹۵؛ Gomis و همکاران، ۲۰۰۰؛ de Britoet و همکاران، ۲۰۰۳؛ Oh و همکاران، ۲۰۱۲؛ Ananias و Yano، ۲۰۰۸). این مطالعه نشان داد که ۸۶٪ *اشریشیا کولای* جدا شده از کلی‌باسیلوز طیور قادر به تولید آئروباکتین می‌باشند و در ۹۶٪ جدایه‌ها ژن *iucD* به عنوان یکی از مهمترین ژن‌های دخیل در بیوسنتز آئروباکتین شناسایی شد. نتایج نشان داد که در ۱۰٪ موارد با وجود شناسایی ژن آئروباکتین، باکتری قادر به تولید این سیدروفور نبود یا شاید در شرایط آزمایش ما این ژن بیان نشده است و یا ژن‌های دیگری که در بیوسنتز آئروباکتین دخیل بوده‌اند در این سویه‌ها وجود نداشته و یا دچار نقص بوده‌اند.



شکل ۱. تصویر الکتروفورز محصول PCR. باندی حدود ۷۱۴ جفت باز مربوط به ژن *iucD* در تمام نمونه های مثبت بر روی ژل آگاروز مشاهده می شود. ستون های مارکر، کنترل مثبت، و کنترل منفی به ترتیب با علائم M, Pos, Neg مشخص شده اند.

در برزیل، جدایه های *اشریشیا کولای* ۶۰ بیمار برزیلی مبتلا به سپتیمی پس از تعیین سروتیپ از نظر وجود برخی از ژن های مربوط به حدت مورد بررسی قرار گرفت که در ۷۸/۳٪ از جدایه ها ژن *iucD* شناسایی شد

(Ananias و Yano، ۲۰۰۸). اما در مطالعه ای دیگر توسط Tiba و همکاران (۲۰۰۸)، درصد کمتری (۲۵/۸٪) از جدایه های بیماری زای دستگاه ادراری در زنان مبتلا به ورم مثانه دارای ژن *iucD* بودند. Gao و همکاران (۲۰۱۲) پس از مطالعه دو سویه موتان *iucD* (فاقد ژن کارا)، ثابت کردند که کلونیزاسیون باکتری در ارگان های داخلی نسبت به سویه وحشی (دارای ژن کارا) کاهش یافته بود و سیستم آتروباکترین در حدت باکتری نقش بیشتری دارد. یافتن ژن *iucD* در ۹۶٪ جدایه های *اشریشیا کولای* بیماری زای طیور در این مطالعه نیز همخوانی نتایج تحقیق ما را با پژوهش های قبلی در این زمینه نشان داد.

یافته های پژوهش حاضر نشان داد که درصد بالائی از جدایه های *اشریشیا کولای* بیماری زای طیور قادر به تولید آتروباکترین می باشند که با توجه به مطالعات مشابه سایر پژوهشگران به ویژه بررسی های مقایسه ای با جدایه های *اشریشیا کولای* به دست آمده از مرغان به ظاهر سالم، وجود یک ارتباط قوی بین تولید آتروباکترین و میزان حدت در سویه های *اشریشیا کولای* طیور را می توان مورد تاکید قرار داد.

درصد در جدایه های *اشریشیا کولای* از سلولیت کلیفرمی گزارش شدند (Ngeleka و همکاران، ۱۹۹۶؛ Gomis و همکاران، ۲۰۰۰؛ de Britoet و همکاران، ۲۰۰۳). گروهی از محققان در سال ۲۰۰۵، جدایه های مختلف *اشریشیا کولای* را از انسان و حیوانات جدا کرده و ۸ ژن مرتبط با حدت را به وسیله روش Multiplex PCR در بین جدایه ها جستجو کردند. در بررسی این محققان، تمام جدایه های *اشریشیا کولای* بیماری زای به دست آمده از کلی باسیلوز طیور دارای ژن *iucD* بودند و از ۹ جدایه مربوط به جدایه های *اشریشیا کولای* غیربیماریزا تنها در ۳ جدایه ژن *iucD* شناسایی شد (Ewers و همکاران، ۲۰۰۵). Ghanbarpour و همکاران (۲۰۱۰) و Oh و همکاران (۲۰۱۲) نیز به ترتیب در ۷۶/۵۶ و ۶۷/۲۴ درصد جدایه های *اشریشیا کولای* بدست آمده از جوجه های گوشتی مبتلا به سلولیت، ژن *iucD* را شناسایی کردند. در مطالعه Oh و همکاران (۲۰۱۲)، که رابطه میان حضور ۹ ژن حدت در ۵۸ جدایه *اشریشیا کولای* به دست آمده از ارگان های داخلی جوجه های مبتلا به سلولیت و میزان مرگ و میر جنین ها مورد بررسی قرار گرفت، بیشترین میزان مرگ و میر جنین به حضور ژن *iucD* نسبت داده شد. این محققان همچنین از ژن های مربوط به تولید آتروباکترین، کلیسین و مقاومت سرمی به عنوان سه ژن مهم در جدایه های بیماری زای *اشریشیا کولای* کلی باسیلوز طیور که در حدت باکتری نقش دارند، نام بردند (Oh و همکاران، ۲۰۱۲).



## Phenotypic and genotypic detection of aerobactin system among *Escherichia coli* isolates from cases of poultry colibacillosis

Yazdani, A.<sup>1</sup>, Peighambari, S.M.<sup>2\*</sup>, Bidoki, S.K.<sup>3</sup>, Hosseini, H.<sup>4</sup>

Received: 25.02.2013

Accepted: 30.12.2013

### Abstract

The purposes of this study were to detect the frequency of aerobactin production and the presence of *iucD* gene, which is involved in biosynthesis of aerobactin system, among *Escherichia coli* isolates from cases of avian colibacillosis. Fifty *E. coli* isolates recovered from pericarditis lesions of poultry colibacillosis were collected from broiler farms in provinces of Tehran, Alborz, and Ghazvin and were tested for their ability to produce aerobactin and the presence of *iucD* gene. Phenotypic determination was performed according to the method described previously. The isolates were examined by PCR for the presence of *iucD* gene. Out of 50 *E. coli* isolates, 43 (86%) had ability to produce aerobactin. PCR showed that out of 50 *E. coli* isolates, 48 (96%) possessed aerobactin encoding gene (*iucD*). However, the *iucD* gene was not detected in two isolates that were negative in phenotypic examination. The findings of the present study showed that high percentages of avian pathogenic *E. coli* isolates are able to produce aerobactin. Considering similar studies completed by other researchers, especially the comparative studies with *E. coli* isolates from apparently healthy animals, a strong association between the aerobactin production and virulence of poultry *E. coli* isolates is emphasized.

**Key words:** *Escherichia coli*, Colibacillosis, Poultry, Aerobactin, *iucD* gene, Iran

1. MSc. Student of Biochemistry, Faculty of Basic Sciences, Payam-Noor University-Tehran branch, Tehran, Iran.
2. Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
3. Department of Genetic and Biochemistry, Faculty of Basic Sciences, Payam-Noor University-Tehran branch, Tehran, Iran.
4. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University-Karj branch, Karaj, Iran.

\*Corresponding author: [mpeigham@ut.ac.ir](mailto:mpeigham@ut.ac.ir)

حقیقی خوشخو، پ.، پیغمبری، س.م. ۱۳۸۳. شناسائی برخی از عوامل حدت جدایه های اشریشیاکلی از موارد کلی باسیلوز طیور، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۵۹ (۳)، ۲۳۳ - ۲۴۰.

**Ananias M., Yano T.** 2008. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Brazilian Journal of Medical Biological Research.* **41**, 877-883.

**Barnes, H.J., Nolan, L.K., Vaillancourt, J.P.** 2008. Colibacillosis. In: *Diseases of Poultry.* Saif, Y.M., Fadly, A.M, Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Swayne, D.E. (eds.) (12<sup>th</sup> ed.). Iowa State Press, Ames, Iowa, USA. p. 691-716.

**Baron, E.J., Finegold, S.M.** 1990. *Diagnostic Microbiology.* USA.

**de Britoet B.G., Gaziri, L.C., Vidotto, M.C.** 2003. Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis. *Infection Immunity.* **71**, 4175-4177.

**de Lorenzo, V., Neilands, J.B.** 1986. Characterization of *iucA* and *iucC* genes of the aerobactin system of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* **167**, 350-355.

**Dozois, C. M., Daigle, F., Curtiss, R.** 3rd. 2003. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proceedings of National Academy of Science USA (PNAS).* **100**, 247-252.

**Ewers, C., Janssen, T., Kiessling, S., Philipp, H .C., Wieler, L.H.** 2005. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Diseases.* **49**, 269-273

**Franck, S.M., Bosworth, B.T., Moon, H.W.** 1998. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *Journal of Clinical Microbiology.* **36**, 1795-1797.

**Gao, Q., Wang, X., Xu, H., Xu, Y., Ling, J., Zhang, D., Gao S., Liu, X.** 2012. Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: salmochelin and aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection model. *BMC Microbiology.* **12**, 143.

**Gomis, S.M., Gomis, A.I., Horadagoda, N.U.** 2000. Studies on cellulitis and other disease syndromes caused by *Escherichia coli* in broilers in Sri Lanka. *Tropical Animal Health Production.* **32**, 341-351.

**Jeffrey, J.S., Nolan, L.K., Tonooka, K.H., Wolfe, S., Giddings, C.W., Horne, S.M., Foley, S.L., Lynne, A.M., Ebert, J.O., Elijah, L.M., Bjorklund, G., Pfaff-McDonough, S.J., Singer, R.S., Doetkott, C.** 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. *Avian Diseases.* **46**, 48-52.

**Johnson, T.J., Siek, K.E., Johnson, S.J., 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**, 745-758.

**Lee, M.D., Arp, L.H.** 1998. Colibacillosis. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.M., Pearson,

J.E., Reed, W.M. (eds). A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4<sup>th</sup> ed., American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania, USA, pp: 14-16.

**Martinez**, J.L., Cercenado, E. Baquero, F. 1989. Aerobactin production and plasmid distribution in *Escherichia coli* clinical isolates. FEMS Microbiology Letter. **51**, 41-44.

**Ngeleka**, M., Kwaga, J.K., White, D.G., Whittam, T.S., Riddell, C., Goodhope, R., Potter, A. A., Allan. B. 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. **46**, 3118-3126.

**Oh**, J.Y., Kang, M.S., Yoon, H., Choi, H.W., An, B.K., Shin, E.G., Kim, Y.J., Kim, M.J., Kwon J.H., Kwon, Y.K. 2012. The embryo lethality of *Escherichia coli* isolates and its relationship to the presence of virulence-associated genes. Poultry Science. **91**, 370-375.

**Ghanbarpour**, R., Salehi, M., Oswald, E. 2010. Virulence genotyping of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis in relation to phylogeny. Comparative Clinical Pathology. **19**, 147-153.

**Parreira**, V.T., Arns, C.W., Tano, T. 1998. Virulence factors of avian *Escherichia coli* associated with swollen head syndrome. Avian Pathology. **27**, 148-159.

**Peighambari**, S.M., Vaillancourt, J.P., Wilson, R.A., Gyles C.L. 1995. Characteristics of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis. Avian Diseases. **39**, 116-124.

**Quinn**, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., Carter, G.R. 1994. Veterinary Clinical Microbiology. Wolf Publishing, London, UK. p. 95-102, 213-218, 220-224, 492-501, 618-619.

**Sambrook**, J., Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning. A laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York, USA. p. 1031-1034 and 504-5017.

**Singer**, R.S., Jeffrey, J.S., Carpenter, T.E., Cooke, C.L., Atwill, E.R., Johnson, W.O., Hirsh, D.C. 2000. Persistence of cellulitis-associated *Escherichia coli* DNA fingerprints in successive broiler chicken flocks. Veterinary Microbiology. **75**, 59-71.

**Tiba**, M.R., Yano, T., Leite, D.S. 2008. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. **150**, 255-260.