تعیین گروه‌های فیلوژنتیک *اشریشیا کلی*‌های جدا شده از عفونت کلی‌باسیلوزیس طیور با استفاده از روش Multiplex-PCR

داود تربیت نازلو[۱]، ابوالفضل جعفری ثالث*[۱]، یاشار باقری‌زاده[۱]، محبوبه عبدلی سنجانی[۱]، فرهاد فرهادی[۲]، مهدی ازدیادی[۲]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران
۲- بخش تحقیق و توسعه، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی(AREEO)، کرج، ایران

دریافت مقاله: ۱۸ آذر ۱۳۹۶، بازنگری: ۴ دی ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۳ بهمن ۱۳۹۶

چکیده

در میان بیماری‌های ایجاد شده توسط *اشریشیا کلی*، نوعی بیماری سیستمیک حاد به نام کلی‌سپتی‌سمی وجود دارد که با حضور *اشریشیا* در خون، کلونیزه شدن در ارگان‌ها شامل قلب، کبد و طحال مشخص می‌شود. هدف از این مطالعه طبقه‌بندی *اشریشیا کلی* جدا شده از عفونت کلی‌باسیلوزیس طیور و بر اساس گروه‌های فیلوژنتیک A ،B1، B2 و D می‌باشد. در این مطالعه ۸۰ سواپ اخذ شده از کبد و محوطه بطنی طیور بر روی محیط مک کانکی آگار کشت داده شدند. کلونی‌های صورتی رنگ جداسازی شده و با انجام آزمون‌های بیوشیمیایی به عنوان *اشریشیاکلی* تأئید شدند. سپس با انجام Multiplex-PCR گروه‌های مختلف فیلوژنتیکی شناسایی گردیدند. از بین ۸۰ نمونه ۲۱ جدایه به عنوان *اشریشیا کلی* شناسایی شدند. ۸ جدایه متعلق به گروه A (۳۸ درصد)، ۲ جدایه متعلق به گروه B1 (۵۹ درصد)، ۶ جدایه متعلق به گروه B2 (۶/۲۸) درصد و ۵ جدایه متعلق به گروه D2 (۸/۲۳ درصد) بودند. بر اساس نتایج مطالعه حاضر گروه‌های مختلف فیلوژنتیک در گله‌های مرغ مادر مشاهده گردید. اغلب آنها در گروه A قرار گرفتند که به عنوان همزیست مطرح می‌باشند. مطالعات نشان می‌دهد که *اشریشیا کلی* پاتوژنیک دارای میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی قابل ملاحظه‌ای می‌باشد که ممکن است به طرق مختلف به گله‌های گوشتی انتقال یابد و منجر به تحمیل خسارت اقتصادی به صنعت طیور گردد. بنابراین گام‌های مهمی باید جهت ریشه‌کنی *اشریشیا کلی* پاتوژنیک برداشته شود.

واژه‌های کلیدی: *اشریشیا کلی، طیور، کلی‌باسیلوز، گروه فیلوژنتیک*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: a.jafari_1392@yahoo.com

مقدمه

اشریشیاکلی به طور طبیعی ساکن دستگاه گوارش حیوانات و انسان است که اکثراً به عنوان یک بیماری‌زای فرصت‌طلب محسوب می‌شود (۱). در پرندگان حدود ۱۵- ۱۰ درصد از جمعیت *اشریشیا کلی* (Avian pathogenic Escherichia coli APEC) دارای قدرت بیماری‌زایی بوده که اغلب به‌دنبال آسیب‌دیدگی سیستم ایمنی و یا تضعیف سد دفاعی پرندگان اهلی، باعث ایجاد عفونت‌های سیستمیک یا مزمن می‌شود (۴-۲). کلی‌باسیلوز طیور یکی از بیماری‌های عفونی پرندگان است که باکتری *اشریشیا کلی* عامل بیماری‌زای اولیه یا ثانوی آن است. بیماری‌های ناشی از این عامل شامل: بیماری هجرز ، کلی گرانولوما، تورم صفاق، تورم مجرای تخم ، التهاب غشای مفاصل ، ورم ناف و تورم کیسه‌های هوایی می‌باشند (۲).

کلی‌باسیلوز در تمام انواع و سنین مختلف طیور و همچنین در سایر پرندگان و بسیاری از پستانداران بروز می‌کند. واگیری‌های گزارش شده در طیور غالباً در ماکیان ، بوقلمون و اردک بروز کرده است. عفونت در پرندگان جوان رایج‌تر از بالغها است. این بیماری در سرتاسر دنیا شایع می‌باشد. به هرحال عفونت با *اشریشیاکلی* از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و در دنیا سالانه ضررهای اقتصادی قابل توجهی را به صنعت طیور کشورها به دلیل افزایش تلفات و افزایش حذف لاشه در فرآیند بازرسی کشتارگاهی تحمیل می‌کند (۵).

مطالعات فیلوژنتیک اخیر نشان می‌دهد که *اشریشیا کلی*‌های پاتوژن خارج روده‌ای اکثراً متعلق به گروه B2 و به میزان کمتر به گروه D متعلق می‌باشند، نتایج حاصل از تایپینگ نمونه‌های حاصل از عفونت‌های ادراری این موضوع را تأیید می‌کند (۶-۷). تحقیقات چندانی در کشور در این خصوص صورت نپذیرفته است. ارزیابی فیلوژنتیکی و تکاملی عوامل ایجاد کننده بیماری‌ها می‌تواند در شناخت هر چه بهتر آنها و راهکارهای مقابله با این عوامل کمک‌کننده باشد. هدف از مطالعه حاضر طبقه‌بندی *اشریشیاکلی* جدا شده از عفونت کلی‌باسیلوزیس طیور و بررسی غالبیت گروه فیلوژنتیک موجود در چنین عفونت‌هایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۸۰ عدد نمونه شامل سواب چرک ناحیه صدری و صفاقی از طیور مرغ مادر مشکوک به کلی‌باسیلوز با علائم بالینی مربوطه در شرایط استریل از مرغداری‌ها، بیمارستان‌های طیور و آزمایشگاه‌های سطح شهر ارومیه اخذ گردید. نمونه‌ها پس از أخذ بلافاصله به آزمایشگاه جهت انجام مراحل کشت و جداسازی انتقال یافت. سواب‌ها در محیط مک‌کانگی‌آگار (Merk 1.05465.0500, Germany) کشت داده شدند و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. کلونی‌های صورتی به روش گرم رنگ آمیزی شدند و تحت کشت مجدد در همان محیط مذکور قرار گرفتند. پس از طی ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باکتری‌های مثبت از نظر استفاده از قندها در محیط TSI، اکسیداز ، اوره‌آز، حرکت مثبت، اندول مثبت، متیل رد مثبت، وژس پروسکوئر منفی، و سیترات منفی به عنوان *اشریشیا کلی* شناسایی شدند و در محیط نوترینت براث (Scharlau Microbiology, Spain) جهت انجام کارهای مولکولی نگهداری گردیدند. با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی(Fermentas, Germany) و براساس پروتکل شرکت سازنده کیت، DNA تمامی‌جدایه‌ها استخراج گردید. مشخصات کامل پرایمرها جهت انجام Multiplex -PCR در جدول ۱ آورده شده‌اند.

جدول ۱- خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده برای Multiplex-PCR

نام پرایمر	ژن هدف	اندازه پرایمر (bp)	توالی پرایمر	اندازه قطعه (bp)
T1	*TSPE4.C2*	۲۴	5'- gagtaatgtcggggcattca	۱۵۲
T2		۲۵	5'- cgcgccaacaaagtattacg	
Y1	*yjaA*	۲۰	5'- tgaagtgtcaggagacgctg	۲۱۱
Y2		۲۰	5'- atggagaatgcgttcctcaac	
C1	*chuA*	۲۰	5'- gacgaaccaacggtcaggat	۲۷۹
C2		۲۰	5'- tgccgccagtaccaaagaca	

Mutiplex –PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از ترکیبات: 5/2 µl بافر PCR، 8/0 µl dNTP، 25/1 µl از هر پرایمر، 6/0 µl Tag polymerase، 1 µl $MgCl_2$، 2 µl DNA الگو و آب مقطر دوبار تقطیر انجام شد. در این واکنش آب مقطر به جای DNA برای کنترل منفی افزوده گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) به ترتیب زیر انجام شد: واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل که هر سیکل شامل: واسرشت ثانویه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۵۹ درجه سانتی‌گراد ۱۰ ثانیه، طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، سنتز نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت۷ دقیقه، الکتروفورز محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگاروز ۱/۸ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (mg/ml10) در ۸۰ ولت به مدت ۱ ساعت انجام گردید. بعد از مشاهده ژل در Gel Document (USA, Bio Rad) تصویر برداری و ثبت اطلاعات انجام گرفت.

نتایج

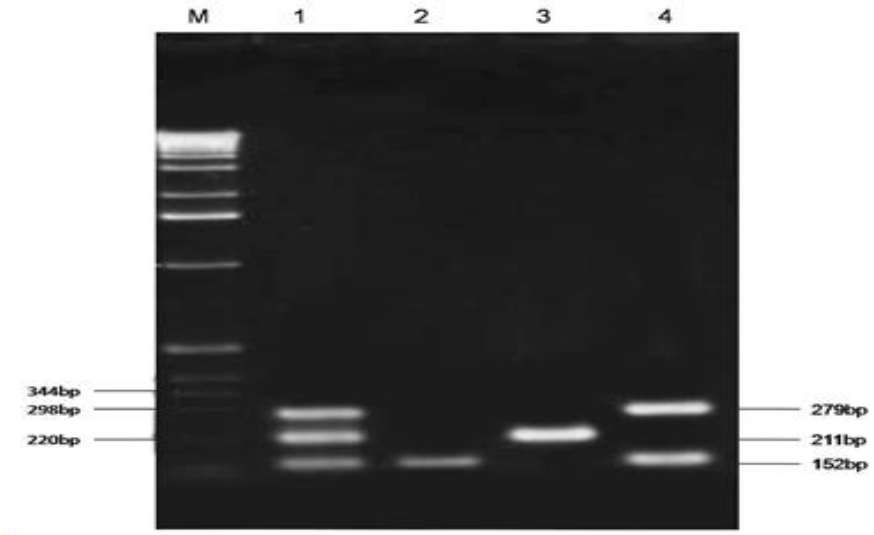
از تعداد ۸۰ نمونه سواب اخذ شده ۲۱ (۲۶/۲۵ درصد) نمونه پس از انجام مراحل رنگ‌آمیزی، کشت و توسط آزمون‌های بیوشیمیایی به عنوان باکتری *اشریشیا کلی* شناسایی شدند. با استفاده از روش Multiplex -PCR 21 جدایه‌ها جهت تعیین گروه فیلوژنتیک مورد بررسی قرار گرفتند.

پرایمرهای مورد استفاده به خوبی توانستند ژن‌های مورد نظر را که شامل *yjaA*، *chuA* و *TSPE4.C2* به ترتیب با اندازه‌های ۲۱۱، ۲۷۹ و bp152 بودند، تکثیر کنند (شکل شماره۱). در کنترل منفی که آب مقطر به جای اسید نوکلئیک اضافه گردید. محصولی مشاهده نشد.

از ۲۱ جدایه *اشریشیا کلی* تعداد ۸ جدایه متعلق به گروه A (۳۸ درصد)، ۲جدایه متعلق به گروه B1 (۵/۹ درصد)، ۶ جدایه متعلق به گروه B2 (۶/۲۸ درصد) و ۵ جدایه متعلق به گروه D2 (۸/۲۳ درصد) می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر از ۸۰ نمونه عفونت کلی‌باسیلوز طیور مادر تعداد ۲۱ جدایه *اشریشیا کلی* مورد شناسایی قرار گرفت. از این بین تعداد ۸ جدایه متعلق به گروه A، ۲جدایه متعلق به گروه B1، ۶ جدایه متعلق به گروه B2 و ۵ جدایه متعلق به گروه D2 به روش Multiplex-PCR مورد شناسایی واقع شدند. در مطالعه قنبرپور و همکاران بر روی موارد اسهال انسانی از ۹۶ جدایه بررسی شده ۵۲/۱ درصد متعلق به گروه A، ۱/۲ درصد متعلق به گروه B1، ۴/۱۰ درصد متعلق به گروه B2 و ۳۵/۴ درصد متعلق به گروه D بودند (۸).



شکل ۱- نتایج Multiplex-PCR، چاهک M: مارکر (Fermentas, Germany)1Kbp ؛ چاهک‌های ۱، ۲، ۳ و۴ به ترتیب گروه‌های فیلوژنتیک B2، B1، A و D

در تحقیقی دیگر توسط اسعدی و همکاران از ۶۰ باکتری جدا شده از عفونت ادراری در جنوب ایران شایع‌ترین گروه‌های فیلوژنتیک به ترتیب D، A و B1 با فراوانی ۷۰، ۲۳/۳ و ۶/۷ درصد بودند و گروه B2 جدا نگردید (۹). در مطالعه‌ای جهت انجام فیلوژنتیک تایپینگ نمونه‌های ادراری نشان داده شد که ۶۵ درصد جدایه‌ها در گروه B2، ۱۹ درصد در گروه D و ۱۶ درصد در گروه A قرار دارند و هیچ یک در گروه B1 قرار ندارند (۱۰). در مطالعه‌ای دیگر بر روی ۱۵۵ جدایه *اشریشیا کلی* در شهرستان بم نشان داده شد که در ۷۱/۶ درصد در گروه A، ۲۲/۳ درصد در گروه B1، ۶۷/۹ درصد در گروه B2 و ۱۵/۴۸ درصد در گروه D قرار دارند. همچنین نشان داده شد که مورد ۲۹ جدایه ژن ST در ۳ گروه فیلوژنتیک با فراوانی (۳۸/۴۱ درصد) A، (۲۸/۴۸ درصد) D و (۳۴/۱۰ درصد) B2 توزیع یافته‌اند (۱۱). عبدی و همکارش در سال ۱۳۹۳ توزیع گروه‌های فیلوژنی A، B1، B2 و D در بین ایزوله‌های جداشده را به‌ترتیب: ۱۷، ۶، ۵۵ و ۲۲ درصد گزارش دادند (۱۲). همچنین سهرابی و همکارش با ارزیابی PCR گروه‌های فیلوژنتیک سویه‌های *اشریشیا کلی* اوروپاتوژنیک نشان دادند که بیشترین میزان فراوانی مربوط به گروه B2 (۶۷/۱۵ درصد)، سپس D (۲۱/۱۷ درصد) و A (۱۱/۶۸ درصد) بود و گروه فیلوژنتیک B1 در ایزوله‌های اوروپاتوژنیک مشاهده نشد. در ایزوله‌های *اشریشیا کلی* کامنسال فراوانی گروه‌ها به ترتیب مربوط به D ۵۲ درصد، B2 ۲۴ درصد، A ۱۴ درصد و B1 ۱۰درصد گزارش شده است (۱۳). در مطالعه دیگری بر روی طیور گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز در شهرستان تبریز از ۷۰ جدایه بیشترین میزان گروه فیلوژنتیک جدا شده متعلق به گروه A گزارش شد (۱۴). در تحقیق حاضر نیز اکثر نمونه‌های جدا شده از موارد کلی‌باسیلوزیس متعلق به گروه A بودند (گروه باکتری‌های همزیست) نتایج این تحقیق با نتایج تحقیقات قبلی هم‌خوانی دارد (۷و۱۵-۱۷). *اشریشیا کلی*‌های پاتوژن ساکن روده از راه دهانی مدفوعی وارد روده می‌شوند (۱۵). Xia و همکاران معتقدند که گوشت طیور بعنوان یکی از عوامل اصلی انتقال *اشریشیا کلی* از طیور به انسان است (۷). مطالعات فیلوژنتیک اخیر نشان می‌دهد که *اشریشیا کلی*‌های پاتوژن خارج روده‌ای اکثراً متعلق

به گروه B2 و به میزان کمتر به گروه D متعلق می‌باشند، و نتایج حاصل از تایپینگ مؤید این یافته می‌باشد (۶-۷).

اشریشیا کلی جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری در این منطقه، بیشتر متعلق به گروه فیلوژنتیک A و B2 بودند که در مقایسه با سایر مناطق از نظر نوع گروه فیلوژنتیکی متفاوت می‌باشند. همچنین نیاز دارد که نهایت دقت در انتخاب درمان مناسب به عمل آید و از درمان بدون انجام آنتی بیوگرام پرهیز شود. در نهایت، انتخاب استراتژی‌های درمانی بر پایه نظارت‌های مستمر ارگانهای بهداشتی، برای جلوگیری از انتقال باکتری‌های مقاوم از طیور به انسان و نیز جلوگیری از انتقال باقی‌مانده دارویی در لاشه طیور به انسان لازم و ضروری می‌باشد.

References

1. Aarestrup FM, Wegener HC, Collignon P. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008; 6:733–750.

2. Nolan, LK, Barnes, HJ, Vaillancourt, JP, Abdul-Aziz, T, Logue, CM. Colibacillosis. In: diseases of poultry.12thedition. (Swayne, D.E., Mcdougald, L., Nolan, K., Suarez, D.L., Nair, V). Iowa, USA: John Wiley and Sons. 2013; 751-805.

3. Barnes HJ, vaillancourt JP, Gross WB. Colibacillosis in: Diseases of Poultry. Editedby Y. M. Saif, B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beardand L. Macdougol. 11thed. Iowa University press, Iowa, USA, 2003:631-647.

4. Wary C, Davies RH. Colibacillosis. In: poultry diseases. Edited by F.T. W. Jordan, M. Pattison, D. Alexander, and T. Foragher, 5thEd. W. b. Saunders Company, U.S.A., 2002; 125-130.

5. Peighambari, SM, Vaillancourt, JP, Wilson, RA, Gyles CL. Characteristics of Escherichia *coli* isolates from avian cellulitis. Avian. Dis. 1995; 65:116-124.

6. Skjøt-Rasmussen L, Olsen SS, Jakobsen L, Ejrnaes K, Scheutz F, Lundgren B, *et al.* *Escherichia coli* clonal group A causing bacteraemia of urinary tract origin. Clin Microbiol Infect. 2013; 19(7):656-61.

7. Xia, X, Meng, J, Zhao, S, Bodeis-jones, S, Gaines, SA, Ayers, SL, *et al.* Identification and antimicrobial resistance of pathogenic *Escherichia coli* from retai meats. J Food Prot. 2011;74**:**38-44.

8. Ghanbarpour R, Daneshdoost S. Identification of shiga toxin and intimin coding genes in *Escherichia coli* isolates from pigeons (Columba livia) in relation to phylotypes and antibiotic resistance patterns. Trop Anim Health Prod. 2012;44**:**307-12.

9. Asadi S, Solhjoo, K, Kargar M, Rezaeian A. Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection in Jahrom city, southern Iran. Journal of Microbial World. 2011; 3(4): 245-250. [In Persian]

10. Etebarzadeh Z, Oshaghi M, Amir Mozafari N. Evaluation of Relationship between Phylogenetic Typing and Antibiotic Resistance of Uropathogenic *Escherichia coli*. J Microbiol World. 2012; 4(3&4):84-92.

11. Alizade H, Ghanbarpour R, Aflatoonian MR, Abdollahi H. Determination of phylogenetic background, fimbrial genes, and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in Bam region, Iran. Comp Clin Path. 2014; 23(5):1253–1257.

12. Abdi HA, Rashki A. The phylogenetic study of Uropathogenic *Escherichia coli* strains in Sistan of Iran. J Birjand Univ Med Sci. 2014; 21(3):385-393.

13. Mikaili P, Ameghi A, Shayegh J, Hassani B, Mahmmudzadeh M. Phylogenic typing of *Escherichia coli* isolated from broilers with collibacillosis in Tabriz, North West of Iran. Arch Razi Inst. 2013; 68(1):43-46.

14. Rodriguez-siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. Characterizing the APEC. pathotype. Vet Res.2005;36:241-56.

15. Kariyawasam S, Scaccianoce JA, Nolan LK. Common and specific genomic sequences of avian and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as determined by genomic subtractive hybridization. BMC Microbiol. 2007;7**:** 81.

16. Obeng AS, Rickard H, Ndi O, Sexton M, Barton M. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry. Vet Microbiol. 2012;154**:**305-15.

17. Sohrabi R, Zeighami H. Determination of Phylogenetic Groups and Antibiotic Resistance in Uropathogenic and Commensal *Escherichia Coli* Isolated from Patients in Zanjan City. Journal of Zanjan University of Medical Sciences & Health Services. 2016; 24(107):107-118.

Identification of phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from colibacillosis in poultry by multiplex-PCR

Davood Tarbiat-Nazloo[1], Abolfazl Jafari-Sales*[2] ,Yashar Bagherizadeh[1] , Mahboubeh Abdoli-senejani[1], Farhad Farhadi[2], Mehdi Ezdiyadi[2]

1- Department of Microbiology, Kazeroon branch, Islamic Azad University, Kazeroon
2- Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj

Receive: December 9, 2017; Revise: December 25, 2017; Accept: February 12, 2018

Summary

Among diseases caused by *Escherichia coli*, there is a severe systemic form termed colisepticaemia, which is characterized by the presence of *E. coli* in the blood, and colonization of organs including the heart, liver and spleen. The aim of the present study was to investigate different phylogenetic groups of *E. coli* isolated from broiler breeder with colibacillosis in Urmia. In this study, eighty swabs collected from liver and lung were cultured on MacConkey agar plates. Pink color colonies were isolated and confirmed as *E.coli* by biochemical tests and followed by multiplex-PCR to identify different phylogenetic groups. Out of 80 samples 21 isolates were identified as *E.coli*. Eight of isolates (38%) were belong to group A, 2 of them (9.5%) were belong to group B1, 6 of them (28.6%) were belong to group B2 and 5 of them (23.8%) were belong to group D2. According to the results of present study different phylogenetic group were observed in breeder herds. Most of them were classified as group A which is commensal. Studies showed that pathogenic *E.coli* has a considerable antibiotic resistance rate which might be transmitted to broilers in different ways and poses economic constraint to poultry industry. Thus, important strides must be made on eradication of different pathogenic *E.coli.*

Keywords: *phylogenetic group, E.coli, poultry, Colibacillosis*