تعیین گروه‌های فیلوژنیک باکتری‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از طیور گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز در شهرستان زابل

یونس تیموری [۱]، رضا اسمعیل زاده دیزجی [۲*]

۱- دستیار تخصصی، بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد
۲- دستیار تخصصی، بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

دریافت مقاله: ۳ آذر ۱۳۹۶، بازنگری: ۲۹ آذر ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۱ بهمن ۱۳۹۶

چکیده

باکتری *اشریشیا کلی* یک ارگانیسم فرصت‌طلب است که می‌تواند در طیور منجر به سندرم‌های کلی‌باسیلوز (کلی‌سپتی‌سمی، پریکاردیت، پری هپاتیت و سالپنژیت و...) گردد. *اشریشیا کلی* دارای ۴ گروه فیلوژنیکی شامل A، B1، B2 و D است. فیلوتایپینگ ایزوله‌های *اشریشیا کلی* روشی مناسب جهت بررسی نوع پراکندگی گروه‌های فیلوژنیک ایزوله‌های *اشریشیا کلی* در مناطق مختلف می‌باشد. بررسی حاضر به منظور تعیین گروه‌های فیلوژنیک *اشریشیا کلی* در شهرستان زابل صورت گرفت، در این مطالعه به منظور تعیین فراوانی گروه‌های فیلوژنیکی باکتری *اشریشیا کلی* جدا شده از طیور گوشتی زابل، ۱۴۴ قطعه جوجه گوشتی مشکوک به کلی باسیلوز نمونه‌گیری شد و در محیط TSB به آزمایشگاه منتقل گردید. با انجام کشت‌های میکروبی و آزمایش‌های بیوشیمایی رایج تعداد ۱۰۰ ایزوله *اشریشیا کلی* تعیین هویت گردید، DNA باکتری‌های ایزوله شده به روش جوشاندن استخراج گردید و به روش triplex PCR گروه‌های فیلوژنیک آنها تعیین شد. در این مطالعه از مجموع ۱۰۰ ایزوله، ۳۶، ۲۷، ۲۳ و ۱۴ درصد به ترتیب در گروه‌های فیلوژنیک B1، D، A و B2 قرار گرفتند. با انجام مطالعه حاضر مشخص گردید که اغلب ایزوله‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از طیور گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز در شهرستان زابل متعلق به گروه‌های فیلوژنیک B1 بودند.

واژگان کلیدی: *اشریشیا کلی، طیور، کلی‌باسیلوز، گروه فیلوژنیک، PCR*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: rezaesmailzade@rocketail.com

مقدمه

سویه‌های *اشریشیا کلی* عامل اصلی بیماری‌هایی چون کلی‌سپتی‌سمی در طیور گوشتی و بومی می‌باشند (۱). این فرم با حضور *اشریشیا کلی* در خون و کلونیزه شدن در ارگان‌های احشایی مختلف شامل قلب، کبد و طحال مشخص می‌شود. عفونت اولیه این باکتری در مجرای تنفسی رخ می‌دهد و در نهایت بیماری‌های گوناگونی را ایجاد می‌کند (۲). عموماً این وضعیت با عفونت کیسه‌های هوایی مشخص می‌شود که ممکن است همراه با سپتی‌سمی، پریکاردیت، پری‌هپاتیت و سالپنژیت باشد (۳). فیلوژنیک شاخه‌ای از علم زیست‌شناسی است که با استفاده از داده‌های توالی‌یابی مولکولی و ماتریکس داده‌های ریخت‌شناسی، به بررسی ارتباط تکاملی گروه‌های مختلف جانداران نظیر گونه‌ها یا جمعیت‌ها می‌پردازد (۴). وجود گروه‌های متمایز فیلوژن در باکتری *اشریشیا کلی* مدت‌هاست تأیید شده است (۵). در حال حاضر چهار گروه شناخته شده شامل A، B1، B2 و D وجود دارد (۶). سویه‌های این گروه‌ها، در ویژگی‌های فنوتیپی خود، از جمله توانایی آنها در استفاده از قندهای مختلف، پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ارتباطات دما و نرخ رشد آنها، متفاوت می‌باشند (۷). اندازه ژنوم نیز در بین این چهار گروه متفاوت است، سویه‌های A و B1 دارای ژنوم‌های کوچکتر از سویه‌های B2 و D می‌باشند (۸).

به نظر می‌رسد سویه‌های این چهار گروه در تمایل به ایجاد بیماری، صفات زیست محیطی و ویژگی‌های پیشینه زندگی، تفاوت‌هایی داشته باشند (۹). اغلب گروه‌های A و B1 همزیست روده‌ای می‌باشند و گروه‌های B2 و به میزان کمتری D شامل سویه‌های بیماری‌زای خارج روده‌ای هستند (۱۰). بیماری‌زایی هر یک از این گروه‌های فیلوژنیک با فعالیت فاکتورهای بیماری‌زای متفاوتی همراه است (۱۱). مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین گروه‌های فیلوژنیک *اشریشیا کلی* عامل بیماری کلی‌باسیلوز جوجه گوشتی در منطقه سیستان انجام گرفت. نتیجه‌ی این تحقیق می‌تواند گامی مؤثر جهت بررسی نوع پراکندگی گروه‌های فیلوژنیک ایزوله‌های *اشریشیا کلی* و متعاقباً درمان دقیق تر بیماری‌های طیور باشد.

مواد و روش‌کار

این مطالعه توصیفی در فاصله‌ی زمانی آذر ماه سال ۱۳۹۳ تا شهریور ماه سال ۱۳۹۴ انجام پذیرفت. به منظور جداسازی باکتری *اشریشیا کلی* عامل کلی‌باسیلوز، از ۱۴۴ قطعه جوجه‌ی مشکوک به بیماری کلی‌باسیلوز از ۸ گله‌ی گوشتی در مناطق مختلف منطقه‌ی سیستان، توسط سوآپ استریل از محوطه‌ی بطنی (ضایعات مختلف بیماری از جمله پری‌هپاتیت، پری‌کاردیت، پریتونیت، عفونت کیسه‌ی زرده، تورم کیسه‌های هوایی و سالپینژیت) نمونه‌گیری شد و در محیط TSB (HIMEDIA) به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل منتقل گردید. نمونه‌ها در محیط TSB به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس برای تعیین هویت نمونه‌ها در محیط کشت Mac Conkey Agar (مرک آلمان) کشت و پس از ۱۸-۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، کلنی‌های مشکوک به *اشریشیا کلی* انتخاب شد. در مرحله‌ی بعد، نمونه‌های مورد نظر در محیط کشت EMB (مرک آلمان) کشت و به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شد و در نهایت پس از انجام آزمایشات بیوشیمیایی استاندارد، ۱۰۰ ایزوله *اشریشیا کلی* شناسایی گردید (۱۲).

استخراج DNA و انجام Triplex-PCR: ابتدا ایزوله‌های *اشریشیا کلی* روی محیط براث TSB به

مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتیگراد گرماخانه‌گذاری گردید. از باکتری‌های رشد یافته، DNA ژنومیک به روش جوشاندن استخراج گردید، بدین صورت که چند کلنی باکتری برداشته شد و در ۲۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه وارد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد جوشانده شد و پس از سانتریفوژ، محلول رویی به عنوان DNA الگو در ۲۰- درجه سانتیگراد به منظور انجام واکنش PCR ذخیره شد (۱۳). کیفیت ایزوله‌های استخراج شده و غلظت آن‌ها با روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت. جهت طراحی پرایمر اختصاصی از نرم افزار CLC Main Workbench و Oligo analyzer استفاده شد، همچنین به منظور بررسی منحصر به فرد بودن پرایمرهای طراحی شده از Blast پایگاه اینترنتی NCBI استفاده گردید و در نهایت از شرکت پیشگام تهیه گردید (جدول ۱).

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی شده

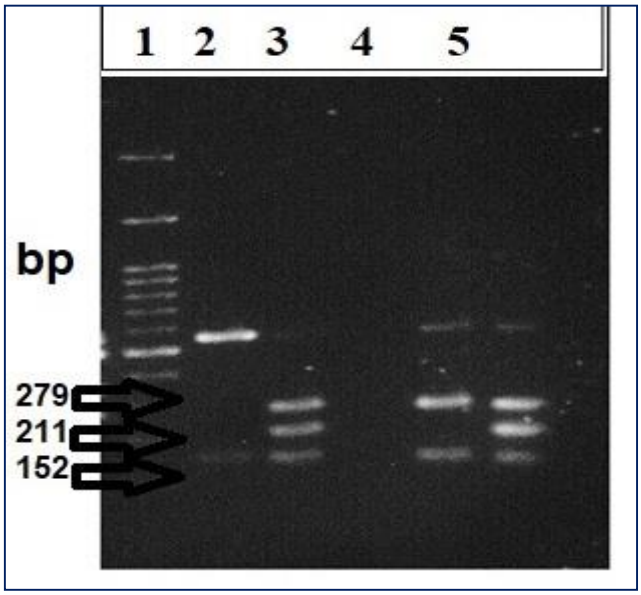
Primer name	Sequence	Length(N)	Band size (bp)	References
ChuA –F ChuA _R	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA	۲۰ ۲۰	۲۷۹	(۱۴)
YjaA_F YjaA _R	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	۲۰ ۲۰	۲۱۱	(۱۴)
TspE4C2 _F TspE4C2 _R	GAGTAATGTCGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG	۲۰ ۲۰	۱۵۲	(۱۴)

برای انجام واکنش PCR مواد مورد نیاز تهیه شد. به طور خلاصه پس از استخراج DNA ژنومی توالی‌های ژن‌های مارکر، chuA، yjaA و قطعه TspE4.C2 با استفاده از روش Triple-PCR تکثیر گردید. برنامه Triple-PCR به صورت یک سیکل در دمای ۳۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۹۰ سیکل شامل: واسرشتگی در دمای ۳۴ درجه به مدت ۹۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو در دمای ۵۵ درجه به مدت ۹۰ ثانیه، طویل شدن رشته الگو در دمای ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و یک سیکل ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه انجام پذیرفت (۱۵).

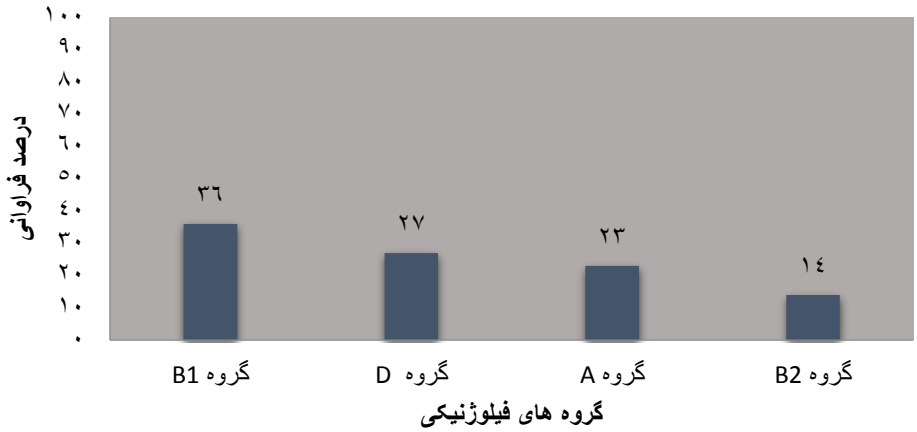
پس از انجام واکنش، ۵ میکرولیتر از محصولات واکنش، در ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۴۰ دقیقه تحت تأثیر ولتاژ ۷۵ الکتروفورز شد و قطعات تکثیر شده با استفاده از نشانگر Ladder 100 ارزیابی شد. گروه‌بندی فیلوژنی بر اساس وجود یا عدم وجود باندهای تکثیری ژن‌های فوق به صورت: گروه B2 ($chuA^+$، $yjaA^+$، $TspE4.C2^{\pm}$)، گروه D ($chuA^+$، $yjaA^-$، $TspE4.C2^{\pm}$)، گروه B1 ($chuA^-$، $yjaA^{\pm}$، $TspE4.C2^-$) و گروه A ($chuA^-$، $yjaA^{\pm}$، TspE4.$C2^+$) با استفاده از روش Clermont و همکاران در سال ۲۰۰۰ انجام شد (۱۵) (شکل ۱).

نتایج

در این مطالعه نمونه‌گیری از ۱۴۴ قطعه جوجه‌ی مشکوک به بیماری کلی‌باسیلوز از ۸ گله‌ی گوشتی در مناطق مختلف شهرستان زابل انجام گرفت و پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی ۱۰۰ ایزوله اشریشیا کلی جداسازی گردید (۶۹/۴۴ درصد). پس از انجام واکنش PCR به روش Multiplex-PCR بر روی DNA های استخراج شده از این ایزوله‌ها، فراوانی گروه‌های فیلوژنی B1، D، A و B2 به ترتیب ۳۶، ۲۷، ۲۳ و ۱۴ درصد مشخص گردید (نمودار ۱). بنابراین گروه فیلوژنی B1 و B2 به ترتیب، بیشترین و کمترین فراوانی را داشتند.



شکل ۱- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات واکنش PCR برای تعیین گروه‌های فیلوژنی: ستون ۱ مارکر، ستون ۲ متعلق به گروه فیلوژنیک B1، ستون‌های ۳ و ۶ متعلق به گروه B2، ستون ۴ متعلق به گروه A و ستون ۵ متعلق به گروه D است.



نمودار ۱- فراوانی گروه‌های فیلوژنتیکی در ایزوله‌های *اشریشیا کلی*

بحث و نتیجه‌گیری

اشریشیا کلی پاتوژن پرندگان عامل بیماری کلی‌باسیلوز بوده و موجب آسیب بافت‌های خارج روده‌ای می‌شود (۱۶). این مطالعه برای اولین بار بر روی *اشریشیا کلی* جدا شده از بیماری کلی باسیلوز و تعیین گروه فیلوژنیک این باکتری در منطقه‌ی سیستان انجام گرفت. نتایج مطالعات گذشته، حاکی از این است که اغلب سویه‌های همزیست *اشریشیا کلی* پاتوژن پرندگان متعلق به گروه فیلوژنیک A می‌باشند (۱۷)، درحالیکه باکتری‌های *اشریشیا کلی* خارج روده‌ای پاتوژن پرندگان (Extra- intestinal pathogenic *E.coli* or ExPEC) اکثراً متعلق به گروه فیلوژنیک B2 و به طور ناچیز متعلق به گروه D می‌باشند (۱۸). این در حالی‌است که در مطالعه Wu و همکارانش در سال ۲۰۱۵، همسو با نتایج مطالعه‌ی حاضر، گروه B1 بیشترین فراوانی را در بین ایزوله‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از لاشه‌های طیور داشت (۳۴ درصد)(۱۹). همچنین در مطالعات Hiki و همکاران در سال ۲۰۱۴ در ژاپن که بر روی *اشریشیا کلی* جدا شده از طیور صورت گرفت، گروه

فیلوژنیک B1 شایع‌ترین گروه بعد از گروه فیلوژنیک A بود (۲۰). در مطالعات Jakobsen و همکارانش در سال ۲۰۱۰، گروه فیلوژنیک A با شیوع ۳۷ درصد شایع‌ترین گروه در بین ایزوله‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از طیور بود (۲۱). در مطالعه‌ی حاضر گروه فیلوژنیک A فراوانی کمتری (۲۳ درصد) داشت و یکی از دلایل این اختلافات می‌تواند تفاوت‌های توزیع جغرافیایی در میکروارگانیسم‌ها باشد. برخلاف نتیجه‌ی این مطالعه، حسنی و همکاران از بین ۷۰ ایزوله *اشریشیا کلی* جدا شده از کلی‌باسیلوز طیور در تبریز فقط ۲ ایزوله را متعلق به گروه فیلوژنیک B1 گزارش کردند، ولی همسو با نتایج این مطالعه، گروه فیلوژنیک D دومین گروه شایع در بین ایزوله‌ها بود (۲۲). در بررسی گروه فیلوژنیک *اشریشیا کلی*‌های با منشأ انسانی، اغلب گروه فیلوژنی B2 و D به ترتیب بیشترین فراوانی را داشتند (۲۳،۲۴). این درحالی‌است که عبدی و همکاران در سال ۱۳۹۱، در مطالعه بر *اشریشیا کلی* جدا شده از عفونت‌های ادراری انسان منطقه‌ی زابل، بالاترین فراوانی را برای گروه فیلوژنیک B1 گزارش کردند که مشابه نتایج مطالعه ی حاضر بود (۲۵). بنابراین یکی از دلایل تشابه بین نتایج این تحقیق و تحقیق حاضر، را می‌توان به شباهت منطقه‌ی جغرافیایی بین دو مطالعه نام اشاره کرد و همچنین امکان گسترش این گروه در بین انسان و طیور گوشتی از طریق آلودگی مدفوعی-دهانی بیشتر بوده است.

با توجه به نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد که آرایش گروه فیلوژنیک می‌تواند در منطقه‌های جغرافیایی مختلف، متفاوت باشد، که در منطقه‌ی سیستان گروه‌های B1 و D در طیور و گروه‌های B1 و A در انسان غالب‌تر هستند. در حالی که سایر تحقیقات، گروه‌های فیلوژنیک B1 و A را بیشتر در حیوانات و گروه‌های فیلوژنیک B2 و D را بیشتر در انسان غالب گزارش کرده‌اند. همچنین در منطقه‌ی سیستان، *اشریشیا کلی* موجود در طیور و انسان هر دو اغلب از نوع کمنسال بوده ولی بر اساس سایر مطالعات *اشریشیا کلی* مربوط به حیوان بیشتر از نوع کمنسال و انسانی بیشتر خارج روده‌ای می‌باشد.

References

1. Nolan LK, Barnes HJ, Vaillancourt JP, Abdul-Aziz T, Logue CM. Colibacillosis. Dis poult. 2013:751-805.

2. Dho M, Lafont J. Escherichia coli colonization of the trachea in poultry: comparison of virulent and avirulent strains in gnotoxenic chickens. Avian Dis. 1982:787-97.

3. Gross W. Diseases due to Escherichia coli in poultry. FAO. 1994.

4. Spaeth R. Morphological character mapping on a molecular phylogeny using pollen variation in the Cryptanthinae (Boraginaceae): Department of Biology, Sonoma State University; 2014.

5. Ochman H, Selander RK. Standard reference strains of Escherichia coli from natural populations. Jl of bacteriol. 1984; 157(2): 690-3.

6. Lecointre G, Rachdi L, Darlu P, Denamur E. Escherichia coli molecular phylogeny using the incongruence length difference test. Mole biol and evol. 1998; 15(12):1685-95.

7. Walk ST, Alm EW, Calhoun LM, Mladonicky JM, Whittam TS. Genetic diversity and population structure ;of Escherichia coli isolated from freshwater beaches .Environ microbiol. 2007; 9(9):2274-88.

8. Bergthorsson U, Ochman H. Distribution of chromosome length variation in natural isolates of Escherichia coli. Mole Biol Evol. 1998; 15(1):6-16.

9. 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. 2008; 10(10):2484-96.

10. Asadi S, Solhjoo K, Kargar M, Rezaeian A. Phylogenetic groups of Escherichia coli strains isolated from urinary tract infection in Jahrom city,

southern Iran. J Microbiol World. 2011; 3:245-50. [In Persian].

11. Miyazaki J, Ba-Thein W, Kumao T, Obata Yasuoka M, Akaza H, Hayshi H. Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic Escherichia coli to adhere to and invade bladder epithelial cells. Pathog Dise. 2002; 33(1):23-6.

12. Zahraei-Salehi T, Shayegh J. Veterinary Microbiology and Microbial Disaese. Tehran, University of Tehran Press, 1386:164-176. [In Persian]

13. Sambrook JR, Russell DW. 2001 Molecular cloning: a laboratory manual. Q Rev Biol. 2001; 76(3):348-9.

14. Mills M, Payne SM. Genetics and regulation of heme iron transport in Shigella dysenteriae and detection of an analogous system in Escherichia coli O157 :H7. J Bacteriol. 1995; 177(11):3004-9.

15. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. Applied and environmental microbiology. 2000; 66(10):4555-8.

16. Gross W, Domermuth C. Colibacillosis. Dise poult. 1991; 9:780-97.

17. 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(1):81.

18. Bashir S, Sarwar Y, Ali A, Mohsin M, Saeed MA, Tariq A, *and et al.* Multiple drug resistance patterns in various phylogenetic groups of uropathogenic Escherichia coli isolated from Faisalabad region of Pakistan. Braz J Microbiol. 2011; 42(4):1278-83.

19. Wu H, Xia S, Bu F, Qi J, Liu Y, Xu H. Identification of integrons and phylogenetic groups of drug-resistant Escherichia coli from broiler carcasses in China. Int J Food Microbiol. 2015; 211:51-6.

20. Hiki M, Usui M, Akiyama T, Kawanishi M, Tsuyuki M, Imamura S, *et al.* Phylogenetic grouping, epidemiological typing, analysis of virulence genes, and antimicrobial susceptibility of Escherichia coli isolated from healthy broilers in Japan. Ir Vet J. 2014; 67(1):14.

21. Jakobsen L, Kurbasic A, Skjøt-Rasmussen L, Ejrnæs K, Porsbo LJ, Pedersen K, *et al.* Escherichia coli isolates from broiler chicken meat, broiler chickens, pork, and pigs share phylogroups and antimicrobial resistance with community-dwelling humans and patients with urinary tract infection. Foodborne Pathog Dis. 2010; 7(5):537-47.

22. Hassani B, Shayegh J, Ameghi A, Mikaili P, Mahmmudzadeh M. Phylogenic typing of Escherichia coli isolated from broilers with collibacillosis in Tabriz, North West of Iran. Arch Razi Inst. 2013; 68(1):43-6.

23. Kotlowski R, Bernstein CN, Sepehri S, Krause DO. High prevalence of Escherichia coli belonging to the B2+ D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. Gut. 2007; 56(5):669-675.

24. Johnson TJ, Wannemuehler Y, Johnson SJ, Stell AL, Doetkott C, Johnson JR, *et al.* Comparison of extraintestinal pathogenic Escherichia coli strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. Appl Environ Microbiol. 2008; 74(22):7043-50.

25. Abdi HA, Rashki A, Rashki Z, Shahkarami F, Shahraki Z. The Relationship Between Phylogenetic Group and Distribution Of Virulence Genes HlyA, IroN, IucD, FimH In Escherichia Coli Isolated From Female Genital Tract Among Women Attending Gynecology Clinics In Zabol-Iran By Multiplex-PCR. Iran J Med Microbiol. 2014; 7(4):9-15. [In Persian].

Phylogenetic typing of *Escherichia coli* isolates collected from broilers with Collibacillosis in Zabol

Younes Teymouri[1]; Reza Esmailzadeh Dizaji *[2]

1 - PhD candidate, Poultry Diseases, Vet medicine Faculty, Shar E Kord University.
2 - PhD candidate, Poultry Diseases, Vet medicine Faculty, Tehran University.

Receive: November 24, 2017; Revise: December 20, 2017; Accept: February 10, 2018

Summary

Escherichia coli is an opportunistic organism which can cause Colibacillosis syndromes (colisepticemia, pericarditis, perihepathitis, salpingitis and …). E.coli has four phylogenetic groups including A, B1, B2 and D. Phylotyping is an adequate method for surveying the dissipation type of the phylogenetic groups of E.coli isolates in different regions. The present study was conducted to determine the phylogenetic groups of E.coli in Zabol city. In order to determine the frequency of the phylogenetic groups of E.coli in Zabol, 144 broilers suspected of Colibacillosis were sampled and samples were transferred to laboratory in TSB. After culturing and applying some common biochemistry tests, a total number of 100 E.coli were isolated. DNA of all isolates was extracted by boiling method and phylogenetic groups were determined by triplex PCR procedure. In this study; 36 %, 27 %, 23 % and 14 % of 100 E.coli isolates belonged to B1, D, A and B2 phylogenetic groups; respectively. The present study concluded that almost all of E.coli samples which were collected from broilers suspected of Colibacillosis in Zabol belonged to B1 phylogenetic group.

Keywords: *Broiler, Colibacillosis, Escherichia coli, Phylogenetic, Zabol*