

بررسی حضور و مقایسه فراوانی *iss* و *bor*، به عنوان دو ژن مؤثر در مقاومت سرمی، در اشریشیا کلی جدا شده از شترمرغ‌های به ظاهر سالم با اشریشیا کلی جدا شده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز

افسانه حسینی^۱، سعید سالاری^۲، احمد راشکی^۲، محمد جهانتیغ^۳

^۱دانش آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، سیستان و بلوچستان، ایران

^۲گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، سیستان و بلوچستان، ایران

^۳گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، سیستان و بلوچستان، ایران

(دریافت مقاله: ۳۱ اردیبهشت ماه ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۲۵ شهریور ماه ۱۳۹۷)

چکیده

زمینه مطالعه: مکانیسم پاتوژنز و نقش فاکتورهای حدت اشریشیاکلی بیماریزای طیور هنوز مبهم است. همان طور که صنعت تکثیر و پرورش شترمرغ رو به رشد است، ارتباط بین شترمرغ و طیور اهلی نیز احتمالاً رو به افزایش می‌باشد. گزارشاتی وجود دارد مفید بودن مطالعه همزمان دو ژن حدت *iss* و *bor* به علت شباهت ساختمانی و عملکردی آن‌ها را در اشریشیاکلی نشان داده است.

هدف: بررسی حضور و مقایسه فراوانی دو ژن مؤثر در مقاومت سرمی در اشریشیاکلی جدا شده از شترمرغ‌های به ظاهر سالم با اشریشیاکلی جدا شده از مدفوع طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز.

روش کار: مطالعه مقطعی-توصیفی است. حضور ژن‌های *iss* و *bor* توسط PCR در اشریشیاکلی جدا شده از نمونه مدفوع شترمرغ‌های به ظاهر سالم و مدفوع طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز بررسی و مقایسه شد.

نتایج: فراوانی ژن *iss* در اشریشیاکلی جدا شده از مدفوع شترمرغ‌های به ظاهر سالم (۵۰ درصد)، بدون تفاوت معنی‌دار، کمتر از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز (۶۴/۴ درصد) بود ($P < 0/05$). فراوانی ژن *bor*، بدون تفاوت معنی‌دار، در اشریشیاکلی جدا شده از مدفوع شترمرغ‌های به ظاهر سالم (۳۱/۸ درصد) بیشتر از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز (۱۵/۶ درصد) مشاهده گردید ($P < 0/05$). فراوانی جدایه‌های اشریشیاکلی حاوی هر دو ژن در مدفوع شترمرغ و طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز، بدون تفاوت معنی‌دار، به ترتیب ۱۷/۲ درصد و ۱۱/۱ درصد حاصل شد ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری نهایی: توزیع آماری دو ژن *iss* و *bor* در مدفوع شترمرغ‌های به ظاهر سالم و طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز یکسان بوده و با توجه به سالم بودن شترمرغ‌های مورد مطالعه، احتمالاً مکانیزم‌های بیماریزایی باکتری در شترمرغ با طیور متفاوت و این جدایه‌ها، عواملی، غیر از ژن‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر را برای ایجاد بیماری در شترمرغ به کار می‌گیرند که این مطلب نیاز به بررسی ژن‌های حدت بیشتری در این جدایه‌ها دارد. به علاوه، می‌توان مدفوع شترمرغ را به عنوان منبعی برای جابجایی ژن *iss* و *bor* بین طیور در نظر گرفت.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلی، *bor*، *iss*، شترمرغ و کلی‌باسیلوز

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله تحقیقات دامپزشکی محفوظ است.

(* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۵۴۲-۴۸۲۲۲۷۸، نمابر: ۰۵۴۲-۴۸۲۲۲۵۱، Email: saeedsalari@uoz.ac.ir

How to Cite This Article

Hosseini, A., Salari, S., Rashki, A., Jahantigh, M. (2019). Presence of Two Genes Involved in Serum Resistance of *Escherichia coli* Isolated From Healthy Ostriches in Comparison With Infected Poultry by Colibacillosis. J Vet Res, 74(1), 143-152. doi: 10.22059/jvr.2017.234300.2635



مقدمه

کلی باسیلوز (Colibacillosis) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی گله‌های طیور صنعتی در ایران و جهان می‌باشد (۲۵) و در بین بیماری‌های متعدد طیور که احتمالاً قابل انتقال به انسان هستند یکی از نخستین نگرانی‌ها می‌باشد (۲۸). از نتایج مهم این بیماری، واگیری و تلفات بالا و صدمات اقتصادی قابل توجهی است که سالیانه به صنعت طیور ایران تحمیل می‌کند (۹، ۱۱، ۱۶، ۲۴، ۲۹، ۳۰، ۳۸، ۴۰).

علت اصلی کلی باسیلوز طیور، شریشیا کلی بیماریزای طیور (Avian *Pathogenic Escherichia coli*, APEC) است (۲۵). در سال‌های اخیر، اطلاعات مفیدی در مورد عوامل حدت APEC و نیز مکانیسم‌های توسعه عفونت بکار گرفته شده توسط این باکتری و نیز ایجاد بیماری، با استفاده از روش‌های دقیق مولکولی حاصل شده است، اما علی‌رغم تلاش محققین، هنوز مکانیسم APEC و مکانیسم پاتوژنز و نقش فاکتورهای حدت آن مبهم است (۳۲، ۳۱، ۳۰، ۸). در نتیجه کنترل کلی باسیلوز در اثر کمبود این اطلاعات مختل شده است (۳۲). ارزیابی دقیق خسارات اقتصادی مرتبط با اشکال مختلف عفونت‌های شریشیا کلی مشکل است چرا که تفاوت در حدت جدایه‌های مختلف شریشیا کلی و تعامل آن با پاتوژن‌های دیگر و عوامل استرس‌زای محیطی در این میان تأثیر گذار است (۲۵).

تکثیر و پرورش شترمرغ (*Struthio camelus*) در مصر، در اواخر قرن نهم، به دلیل شرایط آب‌وهوایی ایده‌آل آن گسترده شد (۱۵). زمانی که ایران واردات شترمرغ را آغاز کرد، صنعت پرورش شترمرغ به طور قابل ملاحظه‌ای در ایران گسترش یافت (۳۷). از طرفی، نگرانی‌هایی درباره وضعیت سلامت پرندگان وارداتی وجود دارد. خصوصاً در رابطه با امکان این که این پرندگان بتوانند به عنوان مخازن ویروس‌ها و باکتری‌های نوظهور نقش بازی کنند (۴۳). همان‌طور که جمعیت شترمرغ رو به رشد است، ارتباط بین شترمرغ‌ها و طیور اهلی احتمالاً رو به افزایش است. اثر این وضعیت روی صنعت مرغ‌داری، پنهان باقی مانده است (۲۶، ۱۴). علی‌رغم اهمیت شریشیا کلی به عنوان بیماریزای طیور، مکانیسم‌های حدت پایه بکار گرفته شده توسط شریشیا کلی برای ایجاد بیماری در پرندگان بویژه شترمرغ پنهان باقی مانده و ویژگی باکتریایی منحصر به فردی که به عنوان نشانی برای ایزوله‌های دارای حدت باشد، شناخته نشده است (۲۶). Tobias و همکاران در سال ۲۰۱۲ بررسی‌هایی روی شترمرغ انجام دادند و بیان کردند که بیماری‌هایی که بوسیله شریشیا کلی ایجاد می‌شوند به عنوان خسارات مهمی برای انسان و حیوانات مطرح هستند (۴۲). با توجه به گسترش مزارع پرورش شترمرغ در کشور و توجه فراوان مسئولین و نیز دامپروران با این جنبه نوین صنعت دامپروری، آگاهی از شیوه صحیح نگهداری این حیوان، پیش‌گیری از بیماری‌های آن و نیز در صورت امکان روش‌های مؤثر درمان این بیماری‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. لازم به ذکر است به علت جوان بودن این صنعت اطلاعات زیادی در خصوص نحوه نگهداری و

پرورش آن نیز در دسترس نمی‌باشد درحالی که بایستی این صنعت را از جهات بسیاری مانند پرورش و تولید و جنبه‌های ژنتیکی و اصلاح نژادی، رفتارشناسی، تجهیزات مورد نیاز و موارد دیگری مورد بررسی قرار داد و کمبودهای آن را توسط تحقیقات علمی انجام گرفته، برطرف نمود تا بدین ترتیب شاهد برطرف شدن مشکلات موجود و ارائه تکنیک‌های پرورشی کارآمد بوده تا بتوان به دنبال آن به بیش‌ترین میزان برگشت سرمایه و کم‌ترین ریسک سرمایه‌گذاری دست یافت (۲۶، ۳۵، ۳۶، ۴۱). از آن‌جا که عوامل بیماریزای طیور صنعتی و شترمرغ‌سانان با هم مشابهند، احتمالاً همان قوانین بهداشتی و کنترلی مورد استفاده در مزارع پرورش طیور صنعتی و بوقلمون‌ها برای این پرندگان نیز می‌تواند تا حدودی صادق باشد (۳۶، ۳۲). مقاومت سرمی در بسیاری از انواع میکروارگانیسم‌های پاتوژن مهم است و یکی از باارزش‌ترین فاکتورهای حدت باکتریایی جهت مطالعه بویژه در بیماری کلی باسیلوز طیور محسوب می‌شود (۲۲). به علت این که شکل بروز کلی باسیلوز طیور اکثراً سپتی سمی است و این فاکتور حدت، نقش مهمی در پاتوژنز این بیماری دارد (۳۹).

ژن *bor* (blue open reading frame gene) با ژن افزایش‌دهنده بقای سرمی یا *iss* (increased serum survival gene) که در شرایط آزمایشگاهی، مقاومت باکتریایی به کمپلمان سرم را افزایش می‌دهد، شباهت زیادی دارد (۴). محصولات این دو ژن حدت، دارای شباهت ساختاری و عملکردی می‌باشند (۲۲). ژن *bor* تنها ژن فاژی است که روی حساسیت سرمی میزبان لیزوژنی مؤثر است و توالی آن در تعداد زیادی از سویه‌های شریشیا کلی یافت شود (۳). فعالیت ژن *bor* به عنوان اولین مثالی شناخته می‌شود که عملکرد یک فاژ را به طور مستقیم در مقاومت به ایمنی به عهده دارد (۲۷). ژن *iss* برای اولین بار توسط Binns و همکاران در سال ۱۹۷۹ توصیف گردید (۶) و در پلاسמיד ColV شریشیا کلی به صورت محافظت‌شده قرار دارد (۱۹). به نظر می‌رسد مطالعه همزمان این دو ژن به علت شباهت بالای ساختمانی و عملکردی مفید باشد (۳۹). از طرفی، کنترل بیماری‌های باکتریایی، بدون آگاهی در زمینه عوامل حدت و روش‌های بیماریزایی باکتری به سادگی قابل دسترس نخواهد بود و در این تحقیق سعی شده است که با تعیین فراوانی و مقایسه فراوانی دو ژن حدت، به نزدیک شدن به این موضوع، در منطقه مورد مطالعه، کمک شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی حضور و مقایسه فراوانی *iss* و *bor*، به عنوان دو ژن مؤثر در مقاومت سرمی، در شریشیا کلی جداشده از شترمرغ‌های به‌ظاهر سالم با شریشیا کلی جداشده از طیور مبتلا به کلی باسیلوز در منطقه بیرجند است.

مواد و روش کار

جامعه آماری و روش نمونه‌گیری: نمونه‌گیری به روش تصادفی ساده از



دوم شامل ۳۵ چرخه و هر چرخه شامل سه گام: گام اول، دناتوراسیون ۴۵ ثانیه در 94°C ، گام دوم شامل اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه در 54°C ، گام سوم شامل طولی شدن قطعات سه دقیقه در 68°C و مرحله سوم بسط و گسترش نهایی که به مدت ۱۰ دقیقه در 72°C انجام شد.

برای ژن *bor*، سه مرحله برنامه شامل واسرشتگی اولیه به مدت ۳ دقیقه در 95°C ، مرحله دوم شامل ۳۰ چرخه و هر چرخه شامل دناتوراسیون ۴۵ ثانیه در 95°C ، اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه در $62/2^{\circ}\text{C}$ و طولی شدن قطعات ۴۵ ثانیه در 72°C ، و مرحله سوم بسط و گسترش نهایی که به مدت هفت دقیقه در 73°C انجام شد.

الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن‌های *iss* و *bor*: ژل
آگارز یک درصد در بافر TBE $0.5\times$ تحت ۸۰ ولت به مدت یک ساعت و ۳۰ دقیقه برای تعیین کمیت و کیفیت تکثیر ژن‌های مورد مطالعه استفاده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه عکس برداری از ژل (Gel) پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه عکس برداری از ژل (Gel) روش تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها با نرم افزار SPSS و آزمون مربع کای، تجزیه و تحلیل شد. مقدار معنی داری کمتر از 0.05 در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج جداسازی فنوتیپی اشریشیاکلی: در این تحقیق تعداد ۱۱۳ نمونه شامل ۵۹ نمونه مدفوع از شترمرغ‌های به ظاهر سالم و ۵۴ نمونه مدفوع از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز جمع‌آوری گردید. از ۵۹ نمونه مدفوع طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز، تعداد ۴۵ جدایه ($83/3$ درصد) و از ۵۹ نمونه مدفوع از شترمرغ‌های به ظاهر سالم، ۴۴ جدایه ($74/6$ درصد) دارای اشریشیاکلی بودند. این نمونه‌ها از نظر حضور ژن‌های *iss* و *bor* از طریق PCR مورد مطالعه قرار گرفتند (تصاویر ۱، ۲).

فراوانی ژن‌های *iss* و *bor* در اشریشیاکلی جداسازی شده از شترمرغ‌های به ظاهر سالم: طبق جدول ۲، ۵۰ درصد از اشریشیاکلی جداسازی شده از شترمرغ‌های به ظاهر سالم دارای ژن *iss* بودند. فراوانی ژن *bor* نیز در اشریشیاکلی جداسازی شده از شترمرغ‌های به ظاهر سالم $31/8$ درصد بود. $18/2$ درصد این نمونه‌ها حاوی هر دو ژن بودند. آنالیز آماری تفاوت معنی داری بین فراوانی دو ژن حدت در جدایه‌های شترمرغ‌های به ظاهر سالم نشان نداد ($P > 0.05$).

فراوانی ژن‌های *iss* و *bor* در اشریشیاکلی جداسازی شده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز: فراوانی ژن *iss* در اشریشیاکلی جداسازی شده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز $64/4$ درصد بدست آمد (جدول ۲). فراوانی ژن *bor* در اشریشیاکلی جداسازی شده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز $15/6$ درصد بود. در این بررسی $11/1$ درصد نمونه‌های اشریشیاکلی جداسازی شده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز حاوی هر دو ژن بودند. آنالیز آماری نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی دار بین فراوانی دو ژن حدت در جدایه‌های طیور کلی‌باسیلوزی بود

مزارع مختلف شترمرغ و مرغ‌داری‌های منطقه بیرجند از اردیبهشت ۱۳۹۴ تا شهریور ۱۳۹۴ انجام شد. تعداد ۵۹ نمونه مدفوع از شترمرغ‌های به ظاهر سالم و ۵۴ نمونه مدفوع از طیور تلف شده از بیماری کلی‌باسیلوز از منطقه بیرجند به روش نمونه برداری مستقیم از رکتوم جمع‌آوری شد و سپس در کمترین زمان در کنار یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل انتقال و در فریزر 80° تا شروع کار آزمایشگاهی ذخیره شد. **جداسازی اشریشیاکلی از مدفوع:** پس از کدگذاری، نمونه‌ها در دمای اتاق یخ‌زدایی شدند و سپس هر نمونه با سوآب هموژنیزه و به صورت خطی در محیط مک کانکی کشت داده شد. سپس پرگنه‌های قرمز رنگ به محیط اتوزین متیلین بلو آگار منتقل شدند و جهت تکثیر به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای 37°C گرمخانه‌گذاری گردید (۴۵).

تایید هویت باکتری براساس آزمون‌های بیوشیمیایی: جهت تفریق باکتری اشریشیاکلی از سایر باکتری‌هایی که در محیط اتوزین متیلین بلو و مک کانکی آگار رشد کرده بودند، پرگنه‌های تک این دو محیط مورد آزمون‌های بیوشیمیایی قرار گرفتند. به این ترتیب که در محیط آگار سه قندی آهن‌دار، محیط آگار سیترات، محیط اوره برات کشت داده شدند و آزمون‌های حرکت، ایندول و متیل رد و وگس پروسکائر انجام شد. برای بدست آمدن پرگنه خالص، یک پرگنه دوباره بر روی محیط اتوزین متیلین بلو آگار کشت داده شد (۴۵).

بررسی حضور ژن *iss* و *bor* توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در اشریشیاکلی جداسازی شده از مدفوع شترمرغ‌های به ظاهر سالم و طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز (مواد واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ژن *iss* و *bor*): مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ به تفسیر ذکر شده است. استخراج DNA به روش جوشاندن انجام شد (۱۲). مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به میزان $25\ \mu\text{l}$ ، شامل $12/5\ \mu\text{l}$ مخلوط مادر (شرکت پیشگام، ایران)، $1\ \mu\text{l}$ از هر کدام از آغازگرهای *iss* Forward و *iss* Reverse (شرکت سیناکلون، ایران)، $7/5\ \mu\text{l}$ آب مقطر دیونیزه و $3\ \mu\text{l}$ از DNA استخراج شده، برای جستجوی ژن *iss* تهیه شد. به منظور ردیابی حضور ژن *bor* در جدایه‌ها، از آغازگرهای *bor* Forward و *bor* Reverse (شرکت سیناکلون، ایران) استفاده شد. در ابتدا مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ژن *bor* به میزان $25\ \mu\text{l}$ تهیه شد که شامل $12/5\ \mu\text{l}$ از مخلوط مادر (شرکت پیشگام، ایران)، $1\ \mu\text{l}$ از آغازگر *bor* Forward و $1\ \mu\text{l}$ از آغازگر *bor* Reverse، $8/5\ \mu\text{l}$ آب مقطر دیونیزه و $2\ \mu\text{l}$ از DNA استخراج شده بود.

برنامه مورد استفاده در دستگاه ترموسایکلر برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ژن *iss* و *bor*: از دستگاه ترموسایکلر اپندروف (Programmable gradient Eppendorf's Master cycler®) (pro, Eppendorf, Hamburg, Germany) برای افزوده سازی DNA استفاده شد. مراحل برنامه مورد استفاده برای ژن *iss* عبارت بود از سه مرحله: مرحله اول شامل چهار دقیقه واسرشتگی اولیه در 94°C ، مرحله



جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن‌های *iss* و *bor*.

منبع	اندازه (bp)	توالی (۵'-۳')	نام آغازگر
(۴۰)	۶۵۸	CTCGATGCAAAATTACACGAAGGAGTTAGCT	<i>borForward</i>
		TAATTTTCTACACATACHATTCTGCGAACT	<i>borReverse</i>
(۱۰)	۳۰۹	ATCACATAGGATTCTGCCG	<i>issForward</i>
		CAGCGGAGTATAGATGCCA	<i>iss Reverse</i>

جدول ۲. فراوانی ژن‌های حدت در جدایه‌های اشریشیاکلی طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز و شترمرغ‌های به ظاهر سالم. ×: دارای تفاوت آماری.

تعداد جدایه دارای ژن <i>iss</i> (درصد)	تعداد جدایه دارای ژن <i>bor</i> (درصد)	تعداد جدایه دارای ژن‌های <i>iss</i> و <i>bor</i> (درصد)
۲۹ (۶۴/۴) ×	۷ (۱۵/۶) ×	۵ (۱۷/۱)
۲۲ (۵۰)	۱۴ (۳۷/۸)	۸ (۱۸/۲)

($P < 0.05$).

کلی‌باسیلوز طیور در منطقه مورد مطالعه برداشته شود.

مقاومت به سرم یکی از مهم‌ترین عوامل دخیل در حدت APEC است (۳۴). ژن افزایش‌دهنده بقای سرمی که در مقاومت سرمی اشریشیاکلی دخالت دارد (۶) به میزان معنی‌داری در اشریشیاکلی بیمار برای طیور بیش‌تر از اشریشیاکلی جدا شده از طیور سالم وجود دارد (۳۸).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فراوانی ژن *iss* در شترمرغ‌های به ظاهر سالم و طیور کلی‌باسیلوزی در منطقه بیرجند، به ترتیب، ۵۰ و ۶۴/۴ درصد می‌باشد که تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد. نتیجه تحقیق حاضر، به عنوان اولین گزارش فراوانی ژن‌های حدت دخیل در مقاومت سرمی در جدایه‌های اشریشیاکلی شترمرغ‌های بالغ قابل احتساب است. در اولین گزارش از فراوانی ژن *iss* در ایران، فراوانی این ژن در طیور به ظاهر سالم ۱۷ درصد و در طیور بیمار ۸۷ درصد گزارش شد (۹) که دارای اختلاف معنی‌داری بود. در تحقیق Delicato و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند که ژن حدت *iss*، بیش‌تر در نمونه‌های کلی‌باسیلوزی نسبت به ایزوله‌های مدفوعی از پرندگان سالم وجود دارد (۷)، در حالی که در تحقیق حاضر تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های شترمرغ‌های به ظاهر سالم و طیور کلی‌باسیلوزی مشاهده نشد. موارد فوق تاییدکننده این موضوع می‌باشد که عوامل بیماری‌زا تأثیر کم‌تری روی شترمرغ دارد یا این که عوامل حدت دیگری در بیماری‌زایی باکتری نقش دارند و یا احتمالاً فراوانی ژن *iss* در گونه‌های مختلف پرندگان متفاوت است. هرچند که گزارش بیماری‌ها در شترمرغ رو به افزایش است، با این حال مقاومت شترمرغ به بیماری بیش‌تر از سایرین می‌باشد. با گسترش صنعت شترمرغ، اهمیت کنترل بیماری‌ها در این صنعت افزایش می‌یابد و احتمالاً عوامل بیماری‌زا درگیری‌های بیش‌تری در این صنعت ایجاد کنند. میزان بیماری‌زایی باکتری در شترمرغ بسته به شرایط محیطی آن است. از طرفی در یک شترمرغ سالم که تحت استرس نباشد، لنفوسیت‌ها و سایر گلبول‌های سفیدمانع از انتقال باکتری‌های موجود در روده از طریق جریان لنف به سیستم عمومی گردش خون بدن می‌شوند. در نتیجه احتمالاً در حضور درصد قابل توجهی از ژن *iss*، بیماری‌ها تظاهرات بالینی نشان نمی‌دهد، در حالی که همین درصد، در طیور، باعث بروز بالینی

مقایسه فراوانی ژن‌های *iss* و *bor* در اشریشیاکلی جدانشده از شترمرغ‌های به ظاهر سالم با اشریشیاکلی جدانشده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز؛ با توجه به جدول ۲، فراوانی ژن *iss* در جدایه‌های شترمرغ‌های به ظاهر سالم کم‌تر از جدایه‌های طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز می‌باشد که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($P > 0.05$). از طرفی فراوانی ژن *bor* در جدایه‌های شترمرغ‌های به ظاهر سالم بیش‌تر از جدایه‌های طیور کلی‌باسیلوزی است. اگر چه باز هم آنالیز آماری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0.05$).

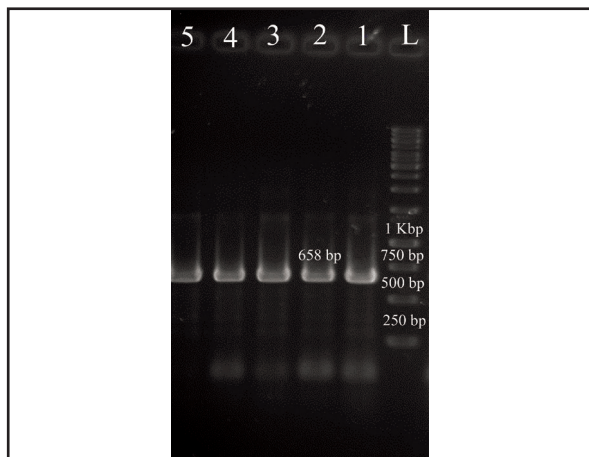
نتایج نشان داد که فراوانی حضور هم‌زمان هر دو ژن مؤثر در حدت در جدایه‌های شترمرغ‌های به ظاهر سالم به طور میانگین به میزان ۱۸/۲ درصد و در جدایه‌های طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز برابر با ۱۱/۱ درصد می‌باشد که با انجام آزمون آماری مشاهده شد که جدایه‌های شترمرغ‌های به ظاهر سالم بیش‌تر از جدایه‌های طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز حامل هر دو ژن می‌باشند. اگر چه نتایج نشان دهنده بیش‌تر بودن فراوانی هم‌زمان دو ژن در جدایه‌های شترمرغ‌های به ظاهر سالم از موارد کلی‌باسیلوزی می‌باشد، اما بین این دو تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲).

بحث

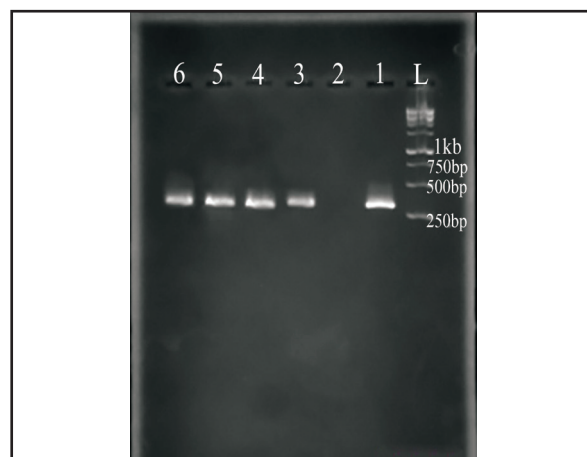
در تحقیق حاضر حضور دو ژن حدت مقاومت به کمپلمان، ژن‌های *iss* و *bor*، در منطقه بیرجند در اشریشیاکلی جدانشده از شترمرغ‌های به ظاهر سالم و اشریشیاکلی جدانشده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز مورد بررسی و فراوانی این دو ژن در نمونه‌های شترمرغ‌های به ظاهر سالم و طیور کلی‌باسیلوزی مورد مقایسه قرار گرفت.

کنترل کلی‌باسیلوز در ابتدا نیازمند آگاهی کامل از چگونگی تهاجم باکتری و شناسایی ژن‌های حدت می‌باشد (۲۱) که این موضوع در مطالعه حاضر مورد توجه قرار گرفته تا با شناسایی و تعیین فراوانی دو ژن حدت که در مقاومت سرمی عامل کلی‌باسیلوز نقش دارند، علاوه بر افزایش دانسته‌ها در مورد اشریشیاکلی جدا شده از شترمرغ، گامی در زمینه کمک به کنترل





تصویر ۲. الکتروفورز محصول PCR ژن *bor* با اندازه باند ۶۵۸ bp بر روی ژل آگارز یک درصد. L: مارکر ۲۵۰ جفت‌بازی. چاهک ۱: کنترل مثبت (۱۳۷۸X). چاهک‌های ۲ و ۳: نمونه‌های مدفوع شترمرغ و چاهک‌های ۴ و ۵: نمونه‌های مدفوع طیور کلی‌باسیلوزی.



تصویر ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن *iss* با اندازه باند ۳۰۹ bp بر روی ژل آگارز یک درصد. L: مارکر ۲۵۰ جفت‌بازی. چاهک ۱: کنترل مثبت (۱۳۷۸X). چاهک ۲: کنترل منفی. چاهک‌های ۳ و ۴: نمونه‌های مدفوع شترمرغ و چاهک‌های ۵ و ۶: نمونه‌های مدفوع طیور کلی‌باسیلوزی.

مختلف در نقاط مختلف دنیا، فراوانی *iss* دارای حداقل میزان ۴/۵ در سال ۲۰۰۹ و حداکثر میزان ۹۶/۴ در سال ۲۰۱۳ می‌باشد (۲).

ژن *bor* اولین بار توسط Barondess و Beckwith در سال ۱۹۹۰ کشف شد که مشخصاً بقای سلول میزبان اشریشیا کلی در سرم حیوان را افزایش می‌دهد (۳،۴). این ویژگی به خوبی به عنوان مشخصه بیماری‌زایی باکتری شناخته شده است (۳،۴،۲۳). تاکنون هیچ مطالعه‌ای در ارتباط با بررسی حضور و فراوانی ژن‌های *bor* و *iss* در شترمرغ و مقایسه آن با اشریشیا کلی جداشده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز در ایران صورت نگرفته است. لذا براساس بررسی منابع موجود، این تحقیق به عنوان اولین گزارش ژن *bor* در شترمرغ بالغ در ایران محسوب می‌شود. نتایج تحقیق حاضر، فراوانی نسبتاً بالایی از ژن *bor* در شترمرغ‌های به ظاهر سالم و طیور کلی‌باسیلوزی را نشان داد. تحقیقات نشان داده‌اند که ژن افزایش‌دهنده بقای سرمی یا *iss* (۶) نقش مهم‌تری در ایجاد مقاومت به کمپلمان نسبت به ژن *bor* دارد (۴۶).

در مطالعه حاضر، میزان فراوانی ژن *bor* در اشریشیا کلی جداشده از شترمرغ‌های به ظاهر سالم ۳۱/۸ درصد و در اشریشیا کلی جداشده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز ۱۵/۶ درصد بود. با توجه به فراوانی آماری یکسان ژن *bor* در شترمرغ و اشریشیا کلی جداشده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز به نظر می‌رسد می‌توان شترمرغ را به عنوان منبعی برای جابجایی این ژن بین طیور در نظر گرفت. به نظر می‌رسد برای تشخیص بیماری کلی‌باسیلوز در شترمرغ نسبت به طیور کلی‌باسیلوزی، ژن *bor* در کنار ژن *iss* کارایی زیادی در منطقه مورد مطالعه نخواهد داشت، زیرا بین طیور بیمار و شترمرغ سالم تفاوت معنی‌داری از نظر فراوانی دو ژن مشاهده نگردید. با تشخیص سریع‌تر بیماری در طیور و به خصوص در شترمرغ، هزینه‌های درمان کاهش یافته، از طرفی بیماری به سرعت تحت کنترل قرار می‌گیرد. در نتیجه تولید افزایش می‌یابد و ضررهای اقتصادی بیماری حاصل از اشریشیا کلی

بیماری کلی‌باسیلوز شده است که این فرضیه نیازمند تحقیق بیشتری در شترمرغ‌های بیمار و مبتلا به کلی‌باسیلوز می‌باشد. تأثیر شترمرغ روی صنعت طیور تاکنون پنهان باقی مانده است ولی این نکته باید مدنظر باشد که با توجه به نتایج مطالعه حاضر انتقال آلودگی از شترمرغ به طیور می‌تواند تلفات سنگینی را ایجاد کند (۵).

ژن *iss* یکی از ژن‌های حدتی است که به طور مشخص در پاتوژنز بیماری حاصل از اشریشیا کلی دارای نقش است (۴۶). Abd El Tawab و همکاران در سال ۲۰۱۴ تحقیقی در مورد ویژگی‌های مولکولی و فنوتیپی تعداد ۱۵۳ اشریشیا کلی بیماریزای طیور، ۳۰ اشریشیا کلی مدفوعی طیور و ۳۶ اشریشیا کلی محیطی انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که ۹۰ درصد همه اشریشیا کلی‌های بیماریزای طیور، ژن *iss* را به عنوان یکی از ژن‌های حدت داشتند (۱).

ژن *iss* در سروتیپ‌هایی از نواحی جغرافیایی مختلف یافت شده است (۹). در اکثر مطالعات انجام شده در نقاط مختلف دنیا فراوانی *iss* در طیور کلی‌باسیلوزی در حدود ۸۲-۷۲ درصد در موارد APEC گزارش شده است (۴۴) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. در بررسی Kafshdouzan و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی اشریشیا کلی جدا شده از کلی‌باسیلوز طیور، فراوانی ژن *iss*، ۶۸/۲ درصد بدست آمد (۲۴). Wen-jie و همکاران در سال ۲۰۰۸ در بررسی ۲۱۶ جدایه اشریشیا کلی بیماریزای طیور در طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز را در نقاط مختلف چین فراوانی ژن *iss* را ۵۸/۸ درصد بدست آوردند (۴۴). در بررسی Jeong و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی ژن‌های حدت ۱۰۱ سویه اشریشیا کلی بیماریزای طیور جداشده از طیور عفونی، فراوانی ژن *iss* ۷۸/۲ درصد بود (۱۷).

با توجه به فراوانی نسبتاً بالای ژن *iss* در طیور کلی‌باسیلوزی، می‌توان این ژن را به عنوان عاملی جهت شناسایی بیماری کلی‌باسیلوز در منطقه مورد مطالعه در تحقیق حاضر در نظر گرفت (۳۳). با توجه به مطالعات



تحقیق حاضر را برای ایجاد بیماری در شترمرغ به کار می‌گیرند که این مطلب نیاز به بررسی ژن‌های حدت بیشتری در این جدایه‌ها دارد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق به عنوان بخشی از پایان نامه جهت اخذ درجه دکتری عمومی دامپزشکی (خانم افسانه حسینی) به انجام رسیده است (شماره ثبت ۱۰۴۳۲). بدین وسیله از مسئولین محترم معاونت پژوهشی دانشگاه زابل و کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی بویژه سرکار خانم سرگلزایی و جناب آقای سعید شهریاری قدردانی و سپاسگذاری می‌شود.

تعارض در منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Abd El Tawab, A. A., Maarouf, A. A. A., Abd El Al, S. A., El Hofy, F. I., El Mougy, E. E. A. (2014). Detection of some virulence genes of avian pathogenic E.coli by polymerase chain reaction. *Benha Vet Med J*, 26 (2), 159-176.
2. Arabi, S., Jafarpour, M., Mirinargesi, M., Asl, S. B., Naghshbandi, R., Shabanpour, M. (2013). Molecular characterization of Avian Pathogenic *Escherichia coli* in broilers bred in Northern Iran. *Glob Vet*, 10(4), 382-386.
3. Barondess, J. J., Beckwith, J. (1990). A Bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage λ . *Nature*, 346 (6287), 871-874. <https://doi.org/10.1038/346871a0> PMID: 2144037
4. Barondess, J. J., Beckwith, J. (1994). *bor* gene of phage λ , involved in serum resistance, encodes a widely conserved outer membrane lipoprotein. *J Bacteriol*, 177(5), 1247-1253. <https://doi.org/10.1128/jb.177.5.1247-1253.1995>
5. Bejaei, M., Cheng, K. M. (2014). A survey of current ostrich handling and transport practices in North America with reference to ostrich welfare and transportation guidelines set up in other countries. *Poult Sci*, 93(2), 296-306. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03417> PMID: 24570450
6. Binns, M. M., Davis, L. D., Hardy, G. K. (1979). Cloned fragments of the plasmid Col V, I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature*

وارد سیر نزولی خواهد شد. باتوجه به تأثیر روی سلامت عمومی و به دلیل احتمال انتقال ژن‌های حدت از شترمرغ به طیور اهمیت بررسی فاکتورهای حدت در شترمرغ دوچندان می‌شود (۱۳، ۱۴).

فراوانی ژن‌های حدت در اشریشیا کلی بیماریزای طیور براساس مکان جغرافیایی و میزبان متفاوت است (۱۰). همچنین، مطالعات بسیاری پیشنهاد کرده‌اند که تعیین و تخمین توزیع پاتوتیپ انواع باکتری‌های بیماریزا در مناطق جغرافیایی و میزبان‌های مختلف، از جمله اشریشیا کلی بیماریزای طیور در سطح مولکولی می‌تواند به عنوان رهیافتی برای کنترل کلی باسیلوز در نظر گرفته شود. این هدف با تعیین فراوانی همزمان ژن‌های حدت قابل انجام است (۲۰، ۱۸). به علت شباهت ساختمانی و عملکردی دو ژن حدت *bor* و *iss* و این نکته که هر دو حفاظت شده‌اند، مطالعه همزمان این دو در مطالعه APEC و کنترل کلی باسیلوز طیور بسیار حائز اهمیت است (۳۱). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که فراوانی حضور همزمان هر دو ژن مؤثر در حدت در جدایه‌های شترمرغ‌های به ظاهر سالم به طور میانگین به میزان ۱۸/۲ درصد و در جدایه‌های طیور مبتلا به کلی باسیلوز برابر با ۱۱/۱ درصد می‌باشد که اگر چه نتایج، نشان دهنده بیشتر بودن فراوانی همزمان دو ژن در جدایه‌های شترمرغ‌های به ظاهر سالم از موارد کلی باسیلوزی می‌باشد، اما بین این دو تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. مطالعاتی در این زمینه، بویژه در مورد شترمرغ، براساس بررسی منابع موجود، یافت نشد تا نتایج مطالعه حاضر در منطقه با سایر مناطق ایران مقایسه شود. *Kafshdouzan* و همکاران در سال ۲۰۱۲ در بررسی توزیع ژن‌های مرتبط با حدت در اشریشیا کلی جداشده از طیور مبتلا به کلی باسیلوز به این نتیجه رسیدند که ۸۵ درصد سویه‌های اشریشیا کلی حداقل یکی از ژن‌های حدت را دارند، در حالی که ۶۶ درصد از سویه‌های اشریشیا کلی جداشده از پرندگان به ظاهر سالم برای حداقل یک ژن حدت مثبت در نظر گرفته شدند (۲۴). نتایج تحقیق حاضر، باز هم نشان دهنده بکارگیری عواملی، غیر از ژن‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر، در جدایه‌های اشریشیا کلی شترمرغ برای ایجاد بیماری است که نیاز به بررسی ژن‌های حدت بیشتری در این جدایه‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری: با توجه به تحقیق حاضر به نظر می‌رسد با توجه به فراوانی آماری یکسان دو ژن *bor* و *iss* بین شترمرغ‌های به ظاهر سالم و طیور مبتلا به کلی باسیلوز احتمالاً مکانیزم‌های بیماریزایی باکتری در گونه‌های متفاوت با یکدیگر اختلاف دارند و برای تشخیص بیماری کلی باسیلوز در شترمرغ نسبت به طیور کلی باسیلوزی، ژن *bor* مشابه ژن *iss* کارایی زیادی در منطقه مورد مطالعه نخواهد داشت. عوامل بیماریزا تأثیر کمتری روی شترمرغ دارد یا این که عوامل حدت دیگری در بیماریزایی باکتری در این موجود نقش دارند. به علاوه، می‌توان شترمرغ را به عنوان منبعی برای جابجایی ژن *bor* بین طیور در منطقه مورد مطالعه در نظر گرفت و احتمالاً جدایه‌های اشریشیا کلی شترمرغ، عواملی، غیر از ژن‌های مورد مطالعه در



- ture, 279(5716), 778-781. PMID: 377103
7. Delicato, E. R., de Brito, B. J., Gaziri, L. C. J., Vidotto, M. C. (2003). Virulence associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet Microbiol*, 94(2), 97-103. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00076-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00076-2) PMID: 12781478
 8. Derakhshandeh, A., Zahraei Salehi, T., Muniesa, M. (2011). Expression and analysis of the complement resistant trait *Iss*, from *E.coli* strain χ 1378 isolated from poultry colibacillosis in Iran. *J Vet Res*, 12(4), 241-245. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2011.78>
 9. Derakhshandeh, A., Zahraei Salehi, T., Tadjbakhsh, H., Karimi, V. (2009). Identification, cloning and sequencing of *Escherichia coli* strain χ 1378 (O78:K80) *iss* gene isolated from poultry colibacillosis in Iran. *Lett Appl Microbiol*, 49(3), 403-407. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02681.x> PMID: 19622075
 10. Dias da Silveira, W., Ferreira, A., Brocchi, M., Maria de Hollanda, L., Pestana de Castro, A. F., Tatsumi Yamada, A., Lancellotti, M. (2002). Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet Microbiol*, 85(1), 47-53. PMID: 11792491
 11. Dou, X., Gong, J., Han, X., Xu, M., Shen, H., Zhang, D., Zhuang, D., Liu, J., Zou, J. (2015). Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated in eastern China. *Gene*, 576(1 Pt 2), 244-248. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.012> PMID: 26475938
 12. Holmes, D. S., Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*, 114(1), 193-197. PMID: 6269464
 13. Huchzermeyer, F. W. (1997a). Animal health risks associated with ostrich products. *Rev Sci Tech*, 16(1), 111-6. PMID: 9329111
 14. Huchzermeyer, F. W. (1997b). Public health risks of ostrich and crocodile meat. *Rev Sci Tech*, 16(2), 599-604. PMID: 9501374
 15. Huchzermeyer, F. W. (2002). Diseases of farmed crocodiles and ostriches. *Rev Sci Tech*, 21(2), 265-76. PMID: 11974614
 16. Huja, S., Oren, Y., Trost, E., Brzuszkiewicz, E., Biran, D., Blom, J., Goesmann, A., Gottschalk, G., Hacker, J., Ron, E. Z., Dobrindt, U. (2015). Genomic avenue to avian coliseptisemia. *MBio*, 6(1), e01681-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01681-14> PMID: 25587010
 17. Jeong, Y. W., Kim, T. E., Kim, J. H., Kwon, H. J. (2012). Pathotyping avian pathogenic *Escherichia coli* strains in Korea. *J Vet Sci*, 13(2), 145-152. <https://doi.org/10.4142/jvs.2012.13.2.145> PMID: 22705736
 18. Johnson, J. T., Johnson, J. S. Nolan, L. K. (2006a). Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. *J Bacteriol*, 188(16), 5975-5983. <https://doi.org/10.1128/JB.00204-06> PMID: 16885466
 19. Johnson, J. T., Siek, K. E., Johnson, S. J. Nolan, L. K. (2006b). DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol*, 188(2), 745-758. <https://doi.org/10.1128/JB.188.2.745-758.2006> PMID: 16385064
 20. Johnson, J. T., Wannemuehler, Y. M., Doetkott, C., Johnson, J. R., Kim, K. S., Spanjaard, L., Nolan, L. K. (2008a). Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl Environ Microbiol*, 74(22), 7043-50. <https://doi.org/10.1128/AEM.01395-08> PMID: 18820066
 21. Johnson, J. T., Wannemuehler, Y. M., Doetkott, C., Johnson, S. J., Rosenberger, S. C., Nolan, L. K. (2008b). Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnosis tool. *J Clin Microbiol*, 46(12), 3987-3996. <https://doi.org/10.1128/JCM.00816-08> PMID: 18842938
 22. Johnson, J. T., Wannemuehler, Y. M., Nolan, L. K. (2008c). Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 74(8), 2360-2369. <https://doi.org/10.1128/AEM.02634-07>
 23. Joiner, K. A. (1998). Complement evasion by



- bacteria and parasites. *Ann Rev Microbiol*, 42, 201-203. PMID: 3059994
24. Kafshdouzan, Kh., Zahraei Salehi, T., NayeriFasaei, B., Madadgan, O., Yamasaki, Sh., Hinenoya, A., Yasuda, N. (2012). Distribution of virulence associated genes in isolated *Escherichia coli* from avian colibacillosis. *Iran J Vet Med*, 7(1), 1-6. <https://doi.org/10.22059/ijvm.2013.32017>
 25. Khoshkhoo, P. H. and Peighambari, S. M. (2005). Drug resistance patterns and plasmid profiles of *E.coli* isolated from cases of avian colibacillosis. *Journal of Veterinary Research*, 60(2), 97-105.
 26. Knobl, T., Baccaro, M. R., Moeno, A. M., Gomes, T. A. T., Vieira, M. A. M., Ferreira, C. S. A., Piantino Ferreira, A. J. (2001). Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from ostriches with respiratory disease. *Vet Microbiol*, 83(1), 71-80. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00403-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00403-5) PMID: 11524167
 27. Li, Y., Chen, L., Wu, X., Huo, S. (2015). Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *Poult Sci*, 94(4), 601-611. <https://doi.org/10.3382/ps/pev008> PMID: 25667425
 28. Lutful Kabir, S. M. (2010). Avian colibacillosis and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *Int J Environ Res Public Health*, 7(1), 89-114. <https://doi.org/10.3390/ijerph7010089> PMID: 20195435
 29. Lynne, A. M., Foley, S. L., Nolan, L. K. (2006a). Immune response to recombinant *Escherichia coli iss* protein in poultry. *Avian Dis*, 50(2), 6-273. <https://doi.org/10.1637/7441-092105R.1> PMID: 16863080
 30. Lynne, A. M., Skyberg, J. A., Logue, C. M., Doerkott, C., Foley, S. L., Nolan, L. K. (2007). Characterization of a series of transconjugant mutants of an avian pathogenic *Escherichia coli* isolate for resistance to serum complement. *Avian Dis*, 51(3), 771-776. PMID: 17992940
 31. Lynne, A. M., Skyberg, J. A., Logue, C. M., Nolan, L. K. (2006b). Detection of *Iss* and *Bor* on the surface of *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol*, 102(3), 660-666. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03133.x> PMID: 17309614
 32. Mohamadi, E., Alizade, H., Askari, N., Salehi, M., Porjafarian, M., Ghanbarpour, R. (2015). Antibiotic resistance profile in relation to phylogenetic background in *Escherichia coli* isolated from fecal samples of healthy ostriches. *International Journal of Enteric Pathogens*, 3(2), e25366. <https://doi.org/10.17795/ijep25366>
 33. Nolan, L. K., Horne, S. M., Gidding, C. W., Foley, S. L., Johnson, T. J., Lynne, A. M., Skyberg, J. (2003). Resistance to serum complement, *iss*, and virulence of avian *Escherichia coli*. *Vet Res Commun*, 27(2), 101-110. <https://doi.org/10.1023/A:1022854902700> PMID: 12718504
 34. Nolan, L. K., Wooley, R.E., Cooper, R.K. (1992). Transposon mutagenesis used to study the role of complement resistance in the virulence of an avian *Escherichia coli*. *Avian Dis*, 36(2), 398-402. PMID: 1320868
 35. Ohadi, H., Haji Babaei, A., Ghaffori, S. A. (2006). *Breeding and Diseases of Ostriches and Other-Related Birds*. (1st ed.) Parto-Vaghe in collaboration with Danensh-Negar. Tehran, Iran. p. 71-75.
 36. Reed, K. D., Meece, J. K., Henkel, J. S., Shukla, S. K. (2003). Birds, migration and emerging zoonoses: west nile virus, lyme disease, influenza A and enteropathogens. *Clin Med Res*, 1(1), 5-12. <https://doi.org/10.3121/cm.1.1.5> PMID: 15931279
 37. Rezaei Far, A., Peighambari, S. M., Sadrzadeh, A., Askari Badouei, M. (2013). Bacterial contamination of dead-in-shell embryos in ostrich hatcheries and antimicrobial resistance patterns of isolated *Escherichia coli*. *Iran J Vet Med*, 7(3), 169-175. <https://doi.org/10.22059/ijvm.2013.35967>
 38. Rodriguez-siek, K.E., Giddings, C.W., Doerkott, C., Johnson, T.J., Nolan, L.K. (2005). Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res*, 36(2), 241-256. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004057> PMID: 15720976
 39. Salari, S., Zahraei Salehi, T., Nayeri Fasaei, B., Karimi, V. (2014). Construction of an *iss* de-



- leted mutant strain from a native avian pathogenic *Escherichia coli* O78: K80 and in vitro serum resistance evaluation of mutant. Iran J Vet Med, 8(1), 1-8. <https://doi.org/10.22059/ijvm.2014.50556>
40. Schouler, C., Schaeffer, B., Bree, A., Mora, A., Dahbi, G., Oswald, F. B. E., Mainil, J., Blanco, J., Moulin – Schouleur, M. (2012). Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. J Clin Microbiol, 50(5), 1673–1678. <https://doi.org/10.1128/JCM.05057-11>
41. Stewart, J. (2013). Ratites. In: Ritchie, B.W., Harrison, G. J., Harrison, L. R. (eds.), Avian Medicine- Principles and Application. Wingers Publishing Inc. Lake Worth, FL, USA. p. 1285-1326.
42. Tobias, F. L., Nunes Garcia, L. N., Masahiko Kanashiro, M., Medina-Acosta, E., Gato Brom-de-Luna, J., Costa de Almeida, C. M., Azevedo Junior, R. R., Lemos, M., Vieira-da-Motta, O. (2012). Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains by neutralizing IgY antibodies from ostrich egg yolk. Braz J Microbiol, 43(2), 544–551. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000200015>
43. PMID: 24031862
- Verwoerd, D. J. (2000). Ostrich diseases. Rev Sci Tech, 19(2), 638-661. PMID: 10935285
44. Wen-jie, J., Zhi-ming, Z., Yong-zhi, Z., Ai-jian, Q., Hong-xia, S., Yue-long, L., Jiao, W., Qian-qian, W. (2008). Distribution of virulence-associated genes of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in China. Agric Sci China, 7(12), 1511-1515. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60410-1](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60410-1)
45. Zahraei Salehi, T., Shayegh, J. (2008). Veterinary Microbiology and Microbial Diseases (Bacterial Pathogens). (2nd ed.) Univerity of Tehran Press. Tehran, Iran. p. 185.
46. Zahraei Salehi, T., Derakhshandeh, A., Tadjbakhsh, H., Karimi, V. (2013). Comparison and phylogenetic analysis of the *ISS* gene in two predominant avian pathogenic *Escherichia coli* serogroups isolated from avian colibacillosis in Iran. Res Vet Sci, 94(1), 5–8. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.07.010> PMID: 22854600



Presence of Two Genes Involved in Serum Resistance of *Escherichia coli* Isolated From Healthy Ostriches in Comparison With Infected Poultry by Colibacillosis

Afsaneh Hosseini¹, Saeed Salari², Ahmad Rashki², Mohammad Jahantigh³

¹DVM, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Sistan and Baluchistan, Iran

²Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Sistan and Baluchistan, Iran

³Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Sistan and Baluchistan, Iran

(Received 21 May 2018, Accepted 16 September 2018)

Abstract:

BACKGROUND: The mechanism of pathogenesis and the role of virulence factors of avian pathogenic *E. coli* is still ill-defined. The ostrich industry is expanding, resulting in the interaction between poultry and ostrich. It is reported that the investigation of *iss* and *bor* virulence genes together, due to their structural and functional similarities, is valuable.

OBJECTIVES: The investigation and comparison of presence of two genes involved in serum resistance, *iss* and *bor*, in *E. coli* isolated from apparently healthy ostriches and poultry with colibacillosis.

METHODS: As a cross-sectional study, *E. coli* was recovered from fecal samples of apparently healthy ostriches and poultry with colibacillosis, and *iss* and *bor* genes were screened and compared via PCR in *E. coli* isolates.

RESULTS: *iss* frequencies, with no statistical difference, were 50% and 64.4% in *E. coli* isolated from apparently healthy ostriches and poultry with colibacillosis, respectively ($P>0.05$). 31.8% and 15.6% of *E. coli* isolated from apparently healthy ostriches and poultry with colibacillosis were positive for *bor*, respectively, with no statistical difference ($P>0.05$). 11.1% of isolates from colibacillosis and 18.2% of isolates from apparently healthy ostriches feces, with no statistical difference, were positive for both genes ($P>0.05$).

CONCLUSIONS: Equal statistical distribution of both genes, *bor* and *iss*, between apparently healthy ostriches and poultry with colibacillosis and the health level of studied ostriches indicated that *E. coli* isolated from ostrich, probably employs other virulence factors instead of *bor* and *iss* to establish a disease. This hypothesis needs to examine more virulence genes in ostrich-origin *E. coli*. In addition, the ostrich feces could be introduced as a source of *iss* and *bor* genes.

Keywords:

bor, Colibacillosis, *Escherichia coli*, *iss*, Ostrich

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Primers used for PCR reaction of *iss* and *bor* genes.

Table 2. Frequency of virulence genes in *E. coli* isolated from apparently healthy ostriches and poultry infected with colibacillosis.

Figure 1. Gel electrophoresis of PCR product of *iss*; L: 250 bp Ladder; Lane 1: Positive control (χ 1378); Lane 2: Negative control; Lane 3, 4: Sampled from apparently healthy ostriches; Lane 5, 6: Sampled from poultry colibacillosis.

Figure 2. Gel electrophoresis of PCR product of *bor*; L: 250 bp Ladder; Lane 1: Positive control (χ 1378); Lane 2, 3: Sampled from apparently healthy ostriches; Lane 4, 5: Sampled from poultry colibacillosis.

