مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۲، دوره ۶۸، شماره ۳، ۲۲۳- ۲۱۷
Original Article
Journal of Veterinary Research. 68,3: 217-223, 2013

تعیین حدت جدایه‌های اشریشیا کولای جدا شده از طیور در ایران با استفاده از تست کشندگی در جوجه‌های یک روزه

سمیه پایروند سید مصطفی پیغمبری * بهرام شجاعدوست
گروه بیماریهای طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران

(دریافت مقاله: ۲۷ دی ماه ۱۳۹۱ ، پذیرش نهایی: ۲۰ فروردین ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینه مطالعه: کلی باسیلوز ناشی از اشریشیا کولای یکی از مهم‌ترین بیماریهای عفونی طیور می‌باشد. درحالیکه تأثیر فاکتورهای حدت اشریشیا کولای در پرنده در تعامل با عوامل تأثیرگذار دیگر می‌تواند متفاوت باشد، صرف وجود آنها تعیین‌کننده میزان حدت باکتری برای پرندگان نمی‌باشد. لذا ضروری است که قدرت بیماریزایی جدایه‌های اشریشیا کولای بر روی پرندگان حساس آزمایش شود. **هدف:** هدف از انجام این مطالعه تعیین میزان حدت و مقایسه اثر ۳ جدایه اشریشیا کولای جداشده از کلی باسیلوز طیور در ایران بر روی جوجه‌های یک‌روزه با بهره‌گیری از تست کشندگی بود. **روش کار:** هفتاد جوجه یک‌روزه به ۳ گروه تیمار ۲۰ قطعه‌ای و ۲ گروه کنترل ۵ قطعه‌ای تقسیم شدند. هر گروه تیمار به یک جدایه اختصاص داده شد و به ۴ زیرگروه ۵ قطعه‌ای تقسیم شد. هر جدایه در محیط آبگوشت مایع رشد داده شد و پس از ۳ بار شستشو با PBS رقیق سازی شد. سپس میزان ۰/۵mL از محلول کشت رقیق نشده (حاوی 10^{9} CFU/mL~ باکتری)، ورقت‌های ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ هرکشت به هرکدام یک از جوجه‌ها در هر زیرگروه ۵ قطعه‌ای از راه زیر جلد در پشت گردن تلقیح شد. به یک گروه کنترل PBS تزریق شد و گروه کنترل منفی نیز چیزی دریافت نکرد. سپس جوجه‌ها تا ۶ روز، هر ۱۲ ساعت کنترل شدند. جوجه‌های تلف شده در طی ۶ روز و همچنین جوجه‌های زنده مانده کالبدگشایی و از قلب و کبد آنها برای آزمایشات باکتریولوژیک نمونه‌گیری شد. حدت هر جدایه اشریشیا کولای بر اساس زمان مرگ، مشاهدات آسیب‌شناسی بارز و یافته‌های باکتری‌شناسی امتیازبندی شد. **نتایج:** کلیه سویه‌های اشریشیا کولای مورد بررسی در این مطالعه توانایی ایجاد تلفات و جراحات بارز کلی باسیلوزی را داشتند. تفاوت معنی‌داری بین جدایه‌ها از نظر حدت در رقت‌های مشابه مشاهده نشد اما تفاوت‌ها با گروه‌های PBS و کنترل منفی معنی‌دار بود ($p\leq$۰/۰۵). **نتیجه‌گیری نهائی:** این مطالعه مشخص نمود که سه جدایه اشریشیا کولای کلی باسیلوز قادر به ایجاد تلفات در جوجه‌های یک‌روزه بودند. این یافته‌ها آگاهی ما را در مورد خصوصیات حدت سه جدایه ایرانی اشریشیا کولای با منشاء کلی باسیلوز طیور افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: اشریشیا کولای، حدت، تست کشندگی، مدل جوجه یک‌روزه

مقدمه

کلی باسیلوز یکی از مهمترین بیماریهای عفونی گله‌های طیور صنعتی می‌باشد (۱،۱۴،۱۶). عامل این بیماری اشریشیا کولای (*Escherichia coli*) است که جزء فلور طبیعی روده‌ی انسان، پستانداران و پرندگان است. عموماً اشریشیا کولای یک پاتوژن فرصت طلب به شمار می‌رود که در پی سرکوب سیستم ایمنی میزبان و وقوع بیماریهای اولیه ویروسی و میکروبی دستگاه تنفس به طور ثانویه بروز می‌کند. غالباً اشریشیا کولای در انسان و پستانداران مسئول عفونت‌های گوارشی است، در حالیکه در گونه‌های اهلی پرندگان موجب عفونت‌های غیر گوارشی عمومی یا موضعی می‌شود که متعاقب آسیب دیدگی یا در هم شکستن سد دفاعی پرنده وقوع می‌یابد. کلی باسیلوز در تمام گونه‌های پرندگان اهلی و در سنین مختلف بروز می‌کند اما عفونت در پرندگان جوان شایعتر است و بیشتر در سنین ۴ تا ۹ هفتگی رخ می‌دهد (۱،۱۴). از علائم بارز بالینی این بیماری ناراحتی تنفسی، تلفات کمتر از ۵ ٪ و شیوع بیش از ۵۰٪ همراه با یافته کالبدگشایی به صورت پلی سروزیت است. عفونت‌های ناشی از اشریشیا کولای صدمات اقتصادی قابل توجهی را سالیانه به صنعت طیور تحمیل می‌کنند. این کاهش سود آوری می‌تواند تمام مراحل تولید از جوجه کشی گرفته تا فرآوری کشتارگاهی را در بر گیرد (۱۴). ارزیابی دقیق خسارات اقتصادی مرتبط با اشکال مختلف عفونت‌های اشریشیا کولای مشکل است چرا که تفاوت در حدت جدایه‌های مختلف اشریشیا کولای و تعامل آنها با عوامل بیماریزای دیگر و عوامل استرس زای محیطی در این میان تأثیر گذار هستند (۱،۱۴،۱۶). فاکتورهای حدتی که غالباً به سویه‌های بیماریزای اشریشیا کولای طیور نسبت داده می‌شوند شامل فیمبریه، دارا بودن تاژک، تولید آئروباکتین، تولید باکتریوسین‌ها، تولید همولیزین، وجود پلاسمیدهای بزرگ، مقاومت دارویی و بعضی عوامل دیگر می‌باشند (۴،۵،۶،۷،۸،۱۵). تأثیر فاکتورها ی فوق در پرنده در تعامل با عوامل تأثیر گذار دیگر می‌تواند متفاوت باشد و وجود آنها صرفاً تعیین کننده میزان حدت جدایه باکتری برای پرندگان نمی‌باشد. لذا ضروری است که قدرت بیماریزایی جدایه‌های اشریشیا کولای در مدل‌های مختلف تجربی بر روی پرندگان حساس آزمایش شود. بنابر این هدف از مطالعه حاضر تعیین میزان حدت و مقایسه تعدادی از جدایه‌های اشریشیا کولای جدا شده از کلی باسیلوز طیور بر روی جوجه‌های یکروزه با بهره گیری از تست کشندگی (Lethality test) بود که خصوصیات فنوتیپی

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۱۵۰ نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲ Email: mpeigham@ut.ac.ir

و بعضی از فاکتورهای حدت آنها در مطالعات قبلی ما مشخص شده بود (۶،۷). اطلاعات کسب شده در این مطالعه سبب افزایش آگاهی ما در خصوص میزان حدت جدایه‌های ایرانی اشریشیا کولای شد و تعاریف کاملتری از جدایه‌های اشریشیا کولای حاصل از مطالعات قبلی ما به دست داد که برای اهداف مختلف تحقیقاتی آینده در کشور بسیار مفید خواهند بود.

مواد و روش کار

باکتری: در این مطالعه به منظور تعیین حدت و مقایسه تعدادی از جدایه‌های اشریشیا کولای جدا شده از موارد کلی باسیلوز طیور بر روی جوجه‌های یک روزه با بهره گیری از تست کشندگی (۳،۹،۱۷) از سه جدایه به شماره‌های EC12، EC50 و EC71 که خصوصیات آنها از جمله فاکتورهای حدت در مطالعات قبلی (۶،۷) مشخص شده بود و در فریزر $-70^{o}C$ نگه داری می‌شدند، استفاده کردیم.

جوجه‌ها: تعداد ۷۰ قطعه جوجه گوشتی با جنسیت مختلط نژاد رأس از یکی از جوجه کشی‌های اطراف تهران تهیه شد. تعداد ۲۰ جوجه یک روزه در ۴ زیر گروه ۵ قطعه‌ای برای هر جدایه مورد استفاده قرار گرفت و ۲ گروه ۵ قطعه‌ای هم به عنوان گروه‌های کنترل PBS و کنترل منفی در نظر گرفته شدند. در ۳ گروه اول که هر گروه شامل ۲۰ جوجه در ۴ زیرگروه ۵ قطعه‌ای بودند، سوسپانسیون تلقیح برای هر جدایه در ۴ رقت تهیه شده و میزان ۰/۵mL از هر رقت به هر کدام یک از جوجه‌ها در یک زیرگروه ۵ قطعه‌ای از راه تزریق زیر جلدی در پشت گردن در یک روزگی تلقیح شد. به گروه ۴ هم PBS استریل به همان روش تزریق گردید. در مورد جوجه‌های گروه ۵ هم تلقیحی (نه باکتری و نه PBS) صورت نگرفت. شرائط نگهداری برای کلیه جوجه‌ها قبل و بعد از تلقیح تا اتمام مطالعه یکسان بود.

تهیه محلول تلقیح: جهت تهیه محلول تلقیح، باکتری‌ها مورد نظر که از قبل خالص شده بودند و در فریزر $-70^{o}C$ نگه داری می‌شدند را از فریزر خارج کرده و در محیط مک کانکی رشد دادیم. سپس از آن یک پرگنه تک صاف برداشت کرده، به محیط Tryptic Soy Broth (TSB) (مرک، آلمان) تلقیح نموده و به مدت ۲۰-۱۸ ساعت در شیکر انکوباتور $37^{o}C$ قرار دادیم. لوله‌های حاوی محیط TSB که باکتری‌ها در آن رشد کرده بودند به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۵۰۰ در دقیقه سانتریفوژ (سیگما ۱-۱۵، آلمان) شدند. پس از ته نشین شدن باکتری‌ها، مایع رویی به دقت خارج گردید و به هر لوله PBS استریل اضافه شد و پس از تکان دادن لوله‌ها و پراکندگی باکتری‌ها مجدداً لوله‌ها در سانتریفوژ قرار گرفتند. شست و شو سه بار انجام گرفت تا محلول تلقیح (اصلی یا رقیق نشده) بدست آید که مقدار ۱۰۰µL میکرو لیتر از آن برای تعیین غلظت محلول تلقیح با استفاده از روش شمارش کلنی برداشت گردید (۱۳). سپس محلول تلقیح اصلی (یا رقیق نشده) سه بار با PBS استریل رقیق شد تا رقت‌های ۱:۱۰ (10^{-1})، ۱:۱۰۰ (10^{-2}) و ۱:۱۰۰۰ (10^{-3}) حاصل شوند.

روش ارزیابی جوجه‌ها بعد از تلقیح: جوجه‌های مورد آزمایش پس از چالش به مدت ۶ روز و هر ۱۲ ساعت یکبار مورد مشاهده قرار گرفتند و زمان مرگ آنها به دقت ثبت شد. تمام جوجه‌های تلف شده در طی این مدت کالبدگشایی شدند و برای کشت باکتری شناسی از قلب و کبد جوجه‌ها نمونه برداری شد (۱۱،۱۳). جوجه‌های هر گروه بر اساس زمان مرگ، جراحات مشاهده شده، و نتایج کشت باکتری شناسی (جدول ۱) امتیاز بندی شدند (۱۱). جوجه‌هایی که تا پایان آزمایش زنده مانده بودند، همگی کشتار شده و پس از کالبدگشایی و مشاهده جراحات برای کشت باکتری شناسی نمونه برداری گردیدند. متوسط امتیاز کسب شده توسط گروه‌های مربوط به سه سویه مورد آزمایش با همدیگر در رقت مشابه و با دو گروه کنترل با روش آماری ANOVA یکطرفه و آزمون توکی با استفاده از نرم افزار SPSS (ver. 10.0) مورد مقایسه قرار گرفتند ($p\leq0/05$).

نتایج

آزمایشات انجام شده نتایج جالبی را به ما نشان داد که در جداول ذیل خلاصه شده است. طبق جدول ۲، در زمان مشابه برای هر ۳ جدایه بیشترین تلفات در گروه EC50 و کمترین تلفات در گروه EC12 مشاهده گردید. در دو گروه کنترل تلفاتی مشاهده نشد. طبق جدول ۳ بیشترین میزان مرگ و میر در جدایه EC12 در زمان ۳۶ ساعت اتفاق افتاده و بقیه تلفات در زمان‌های بعدی به شکل پراکنده رخ دادند. طبق جدول ۴ بیشترین میزان مرگ و میر در جدایه EC50 در زمان کمتر از ۳۶ ساعت اتفاق افتاد و تنها دو جوجه از کل گروه باقی ماندند که یکی از آنها هم در زمان ۴۸-۳۶ ساعت تلف شد. طبق جدول ۵ بیشترین میزان مرگ و میر در جدایه EC71 در زمان کمتر از ۳۶ ساعت اتفاق افتاد و بقیه تلفات در زمان‌های

جدول ۱. سیستم نمره دهی مورد استفاده در این مطالعه. هر جوجه‌ای که طی شش روز پس از چالش تلف شد نمره ۴ را دریافت کرد. و علاوه بر آن نمره زمان مرگ هم به نمره ۴ اضافه شد. شش روز پس از چالش، همه جوجه‌های زنده مانده، کشتار و کالبد گشایی شدند و بر اساس معیارهای ذکر شده در این جدول نمره دهی گردیدند. بیشترین نمره هر گروه (۵ جوجه) برابر با ۴۰ (۱۰۰٪) بود.

مشاهدات	نمره
جوجه‌هایی که طی شش روز پس از تزریق تلف می‌شوند	۴
متوسط زمان مرگ کمتر از ۳۶ ساعت	۴
متوسط زمان مرگ بین ۴۸-۳۶ ساعت	۳
متوسط زمان مرگ بین ۶۰-۴۸ ساعت	۲
متوسط زمان مرگ بیش از ۶۰ ساعت	۱
جوجه‌های زنده مانده پس از شش روز از زمان چالش:	
آماس کیسه‌های هوایی	۱
پریکاردیت	۱
پری هپاتیت	۱
جدا شدن اشریشیا کولای	۱
بیشترین امتیاز در هر گروه (دارای ۵ جوجه)	۴۰=۱۰۰٪

جدول ۲. میزان مرگ و میر جوجه‌ها در مدت شش روز پس از چالش در گروه‌های مورد آزمایش (هر گروه دارای پنج جوجه). [۱] سوسپانسیون اصلی (رقیق نشده) حاوی حدوداً 10^9 CFU/mL باکتری بود که به نسبت ۱:۱۰ سه بار رقیق شد.

رقت	سویه EC12	سویه EC50	سویه EC71	PBS	کنترل منفی
اصلی[۱]	۴	۵	۵	۰	۰
-۱	۴	۵	۵	۰	۰
-۲	۲	۵	۴	۰	۰
-۳	۲	۴	۳	۰	۰

جدول ۴. زمان مرگ و تعداد تلفات در جوجه‌های چالش شده با سویه EC50 در مدت شش روز پس از چالش (هر گروه دارای پنج جوجه).

دوز چالش (CFU/mL)	زمان مرگ (ساعت)			
	<۳۶	۳۶-۴۸	۴۸-۶۰	>۶۰
2×10^9	۴	۱	۰	۰
2×10^8	۵	۰	۰	۰
2×10^7	۵	۰	۰	۰
2×10^6	۴	۰	۰	۰

بعدی بصورت پراکنده رخ دادند. با توجه به نتایج جداول فوق بیشترین میزان مرگ و میر در هر ۳ جدایه مورد مطالعه، در زمان کمتر ۳۶ ساعت اتفاق افتاد که در این بین بیشترین مرگ مربوط به جدایه EC50 بود. در گروه سویه ۱۲، با کاهش تعداد باکتری و افزایش رقت، متوسط امتیاز گروه کاهش یافت. درگروه سویه ۵۰، ۳ گروه اول تقریباً حداکثر امتیاز را طبق جدول ۱ کسب نمودند. درگروه سویه ۷۱، با کاهش تعداد باکتری و افزایش رقت، متوسط امتیاز گروه کاهش یافت. بر طبق جدول ۶، سویه‌ی EC12 در تمام رقت‌ها هیچ تفاوت آماری معنی‌داری از نظر کشندگی با سویه‌های EC50 و EC71 نداشت ولی در رقت‌های 10^8 و 10^9 با هر دو گروه کنترل تفاوت آماری آن معنی‌دار می‌باشد. اما در رقت‌های 10^6 و 10^7 هیچگونه تفاوت آماری معنی‌داری با هر دو گروه کنترل نشان نداد. سویه EC50 در تمام رقت‌ها هیچ تفاوت آماری معنی‌داری از نظر کشندگی با سویه EC71 نداشت ولی در تمامی رقت‌ها با دو گروه کنترل اختلاف آن معنی‌دار بود. سویه EC71 به جز در رقت 10^6 با هر دو گروه کنترل تفاوت آماری معنی‌داری داشت.

بحث

پژوهش‌های بسیاری روی جدایه‌های گوناگون اشریشیا کولای از نظر دارا بودن فاکتورهای حدت انجام شده است و برخی از عوامل حدت در این باکتری شناسائی شده است (۴،۵،۶،۷،۸،۱۵). جدایه‌های اشریشیا کولای ممکن است از نظر دارا بودن فاکتورهای حدت با هم متفاوت باشند. در ایجاد بیماری کلی باسیلوز علاوه بر باکتری، شرایط مستعدکننده میزبان و محیط نیز دارای نقش‌های بسیار اساسی هستند

جدول ۳. زمان مرگ و تعداد تلفات در جوجه‌های چالش شده با سویه EC12 در مدت شش روز پس از چالش (هر گروه دارای پنج جوجه).

دوز چالش (CFU/mL)	زمان مرگ (ساعت)			
	<۳۶	۳۶-۴۸	۴۸-۶۰	>۶۰
3×10^9	۳	۱	۰	۰
3×10^8	۱	۲	۰	۱
3×10^7	۲	۰	۰	۰
3×10^6	۱	۰	۱	۰

جدول ۵. زمان مرگ و تعداد تلفات در جوجه‌های چالش شده با سویه EC71 در مدت شش روز پس از چالش (هر گروه دارای پنج جوجه).

دوز چالش (CFU/mL)	زمان مرگ (ساعت)			
	<۳۶	۳۶-۴۸	۴۸-۶۰	>۶۰
2×10^9	۵	۰	۰	۰
2×10^8	۴	۱	۰	۰
2×10^7	۳	۰	۱	۰
2×10^6	۲	۰	۰	۱

(۱،۲،۱۶،۱۸). اما در خصوص باکتری، مطالعات پیشین نشان داده است که جدایه‌های گوناگون اشریشیا کولای توانائی بیماریزائی متفاوتی دارند. برای تعیین تفاوت قدرت بیماریزائی جدایه‌های اشریشیاکولای، پژوهشگران از مدل‌های مختلف آزمایش تجربی بر روی حیوان استفاده نموده‌اند (۲،۳،۹،۱۰،۱۱،۱۷،۱۸). تست کشندگی در جوجه‌های یکروزه، یکی از مدل‌های رایج برای تعیین تفاوت حدت جدایه‌های اشریشیاکولای می‌باشد که مکررا مورد استفاده محققین قرار گرفته است (۲،۳،۱۰،۱۱). با توجه به مطالعات پیشین ما در مورد فاکتورهای حدت جدایه‌های اشریشیا کولای بدست آمده از جراحات تیپیک بیماری کلی باسیلوز (۶،۷)، در مطالعه ی حاضر از سه جدایه دارای فاکتورهای حدت مشخص برای تعیین قدرت بیماریزائی در مدل جوجه یک روزه استفاده گردید.

سه جدایه استفاده شده در مطالعه حاضر، همگی دارای پلاسمیدها، خصوصیت مقاومت سرمی و تولید کننده کلیسین بودند. جدایه EC71 علاوه برسه مورد بالا، دارای تحرک و تولید کننده کلی سین V هم بود و سویه EC12 علاوه بر سه فاکتور نامبرده در بالا، تولید کننده آئروباکتین هم بود. نکته ی جالب توجه در این مطالعه این بود که جدایه‌ای که پلاسمید بیشتری داشت اما تحرک، تولید کلی سین V و آئروباکتین را نداشت در زمان کوتاهتری سبب مرگ جوجه‌ها شد و جدایه‌ای که پلاسمید کمتری نسبت به هر دو جدایه داشت اما تولید کلی سین V و حرکت را داشت در رتبه ی دوم قرار گرفت و جدایه آخر که تولید آئروباکتین هم داشت و از نظر محتوی پلاسمیدی تنها یک اختلاف با جدایه رتبه دوم را داشت، رتبه آخر را کسب نمود. بعضی محققین وجود پلاسمیدهای

جدول ۶. مقایسه نتایج آزمایش حدت سه جدایه اشریشیاکولای در جوجه‌های یکروزه.[۱] سیستم نمره دهی (به جدول ۱ ارجاع شود). سه سویه مورد آزمایش با همدیگر در رقت مشابه و با دو گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفتند. حروف سوپراسکریپت متفاوت در یک رقت مشابه و در گروه‌های کنترل نشاندهنده تفاوت معنی‌دار آماری می‌باشد ($p\leq ۰/۰۵$).[۲] گروه کنترل منفی شامل جوجه‌هایی بود نه باکتری و نه PBS دریافت کردند.

گروه	دوز چالش	تعداد تلفات بین ۵ جوجه	متوسط زمان مرگ (ساعت)	تعداد جوجه‌های با جراحت از جوجه‌های زنده مانده	جداسازی اشریشیاکلی از جوجه‌های زنده مانده	متوسط امتیاز گروه[۱]	حداکثر امتیاز گروه (٪)
سویه EC12	۳×۱۰^{۹}	۴	۳۰	۱از۱۰	۱از۱۰	$۶/۲۰^{a}$	۳۱ (۷۷/۵۰)
سویه EC50	۲×۱۰^{۹}	۵	۱۹/۲۰	۰از۱۰	۰از۱۰	$۷/۸۰^{a}$	۳۹ (۹۷/۵۰)
سویه EC71	۲×۱۰^{۹}	۵	۱۴/۴۰	۰از۱۰	۰از۱۰	۸^{a}	۴۰ (۱۰۰)
سویه EC12	۳×۱۰^{۸}	۴	۵۷	۱از۱۰	۱از۱۰	$۵/۴۰^{a}$	۲۷ (۶۷/۵۰)
سویه EC50	۲×۱۰^{۸}	۵	۱۴/۴۰	۰از۱۰	۰از۱۰	۸^{a}	۴۰ (۱۰۰)
سویه EC71	۲×۱۰^{۸}	۵	۳۱/۲۰	۰از۱۰	۰از۱۰	$۷/۸۰^{a}$	۳۹ (۹۷/۵۰)
سویه EC12	۳×۱۰^{۷}	۲	۱۲	۱از۳	۲از۳	$۴^{a,b}$	۲۰ (۵۰)
سویه EC50	۲×۱۰^{۷}	۵	۲۴	۰از۱۰	۰از۱۰	۸^{a}	۴۰ (۱۰۰)
سویه EC71	۲×۱۰^{۷}	۴	۳۹	۱از۱۰	۱از۱۰	۶^{a}	۳۰ (۷۵)
سویه EC12	۳×۱۰^{۶}	۲	۴۸	۳از۱۰	۱از۳	$۳^{a,b}$	۱۵ (۳۷/۵۰)
سویه EC50	۲×۱۰^{۶}	۴	۲۴	۱از۱۰	۱از۱۰	$۶/۴۰^{a}$	۳۲ (۸۰)
سویه EC71	۲×۱۰^{۶}	۳	۴۰	۱از۲	۱از۲	$۴/۶۰^{a,b}$	۲۳ (۵۷/۵۰)
PBS	-	۰	-	۵از۱۰	۵از۱۰	۰^{b}	۰
کنترل منفی[۲]	-	۰	-	۵از۱۰	۵از۱۰	۰^{b}	۰

بزرگ را از عوامل حدت دانسته‌اند (۲۰). البته تحقیقات متعدد قبلی، بیماریزائی اشریشیاکولای در طیور را وابسته به تأثیر فاکتورهای متعدد می‌دانند که هر کدام در مراحل مختلف مکانی یا زمانی در بدن پرنده تأثیر خود را بروز می‌دهند (۴،۵،۶،۷،۸،۱۲،۱۵،۱۹،۲۱). با توجه به ناکامل بودن اطلاعات ما در مورد جدایه‌های مورد استفاده در این مطالعه از نظر دارا بودن همه فاکتورهایی که تا کنون به عنوان فاکتورهای حدت اشریشیاکولای طیور شناخته شده‌اند، مشکل است که تفاوت در بیماریزائی جدایه‌ها را منتسب به فاکتورهای خاصی بدانیم.

از آنجایی که کنترل کلی باسیلوز به علت فقدان آزمون تشخیصی مناسب برای تفریق بین جدایه‌های بیماریزای اولیه با حدت بالا و جدایه‌های غیر بیماریزا، دشوار است، بنا براین حدت جدایه‌های اشریشیاکولای پرندگان می‌تواند با تلقیح آن به جوجه‌ها تخمین زده شود (۲،۳،۹،۱۰،۱۱،۱۷،۱۸). در فرانسه، محققین ۵۹ جدایه اشریشیاکولای را به صورت زیر جلدی به جوجه‌های یکروزه تلقیح کردند و تلفات را طی ۴ روز بررسی کردند و جدایه‌ها را در ۳ گروه کشنده، کشنده متوسط و غیر کشنده تقسیم کردند. مشاهدات این محققین نشان داد که فاکتورهای چسبندگی و خصوصیت جذب آهن در ۵۲٪ سویه‌های بسیار کشنده با هم حضور داشتند در حالیکه تنها در ۵٪ سویه‌ها با کشندگی متوسط با هم دیده شدند و در سویه‌های غیر کشنده اصلاً دیده نشد (۳). در بررسی دیگری در فرانسه، پژوهشگران به مقایسه بیماریزائی سویه اشریشیاکولای سروگروپ O2 در جوجه‌های Axenic و SPF با و بدون عوامل حدت در مدل جوجه یک روزه پرداختند (۲). سویه بیماریزای آنها، سه فاکتور چسبندگی، اکتساب آهن و تولید کپسول پلی ساکاریدی k1 را دارا بود و چه در جوجه‌های Axenic و چه SPF، تلفات طی روزهای ۷-۵ پس از تلقیح و جراحات کلی باسیلوز (پری کاردیت، پری هپاتیت و آماس کیسه‌های هوایی) را ایجاد کرد. همچنین باکتری از خون قلب و کبد و از کیسه‌های هوایی جدا شد. در حالیکه در جوجه‌های تلقیح شده با سویه غیر بیماریزای مشابه، جراحات کلینیکی واضحی مشاهده نشد. در مطالعه‌ای دیگر در ایالات متحده آمریکا، پژوهشگران برای تمایز بین جدایه‌های بیماریزا و غیر بیماریزای اشریشیا کولای جدا شده از طیور در جوجه خروس یکروزه، باکتری‌ها را به کیسه هوایی سمت چپ جوجه‌ها تلقیح نمودند. سویه‌های بیماریزا سبب تلفات و ایجاد جراحات پریکاردیت، پری هپاتیت و آماس کیسه‌ها ی هوایی در جوجه‌های مورد مطالعه شد. اما سویه‌های غیر بیماریزا هیچکدام از ضایعات را ایجاد نکردند (۱۰).

در مطالعه حاضر نیز، باکتری‌ها در رقت‌های مختلف به جوجه‌ها از طریق زیر جلد تزریق شد تا بهتر بتوان میزان کشندگی جدایه‌های اشریشیا کولای را سنجید، یعنی علاوه بر مقایسه کشندگی جدایه با هم، جدایه‌ها در رقت‌های مختلف با هم مورد ارزیابی قرار گرفتند و در پایان نتیجه گرفته شد که سه جدایه مورد استفاده از نظر کشندگی در هیچ یک از رقت‌ها تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند، با اینکه در برخی فاکتورهای حدت با همدیگر مشابه و در برخی دیگر متفاوت بودند. بطور کلی این

مطالعه نشان داد که جدایه‌های حاصل از جراحات کلی باسیلوزی که دارای فاکتورهای حدت می‌باشند توانایی ایجاد تلفات و جراحات تیپیک کلی باسیلوزی را دارند اما در خصوص پتانسیل هر کدام از فاکتورها و ارتباط آنها با هم دیگر مطالعات گسترده تری لازم است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با استفاده از اعتبارات پژوهشی شورای پژوهشی دانشگاه تهران (به شماره ۷۵۰۸۰۰۷/۶/۱۳) انجام شده است.

References

1. 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.) (12th ed.). Blackwell Publishing Professionals, Ames, Iowa, USA. p. 691-737.
2. Brèe, A., Dho, M., Lafont, J.P. (1989) Comparative infectivity for Axenic and specific-pathogen-free chickens of O2 *Escherichia coli* strains with or without virulence factors. Avian Dis. 33: 134-139.
3. Dho, M., Lafont, J.P. (1984) Adhesive properties and iron uptake ability in *Escherichia coli* lethal and nonlethal for chicks. Avian Dis. 28: 1016-1025.
4. Emery, D.A., Nagaraja, K.V., Shaw, D.P., Newman, J.A., White, D.G. (1992) Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. Avian Dis. 36: 504-511.
5. Foley, S.L., Home, S.M., Giddings, C.W., Robinson, M., Nolan, L.K. (2000) Iss from a virulent avian *Escherichia coli*. Avian Dis. 44: 158-191.
6. Khoshkhoo, P.H., Peighambari, S.M. (2004) Characteristics of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis. J Vet Res. 59: 233-240.
7. Khoshkhoo, P.H., Peighambari, S.M. (2005) Drug resistance pattern and plasmid profile of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis. J Vet Res. 60: 97-105.
8. Ngeleka, M., Brereton, L, Brown, G., Fairbrother, J.M. (2002) Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to *tsh* -, *pap*-, *pit*-, and *iuc* - DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and. the cloacae of broilers. Avian Dis. 46: 143-152.
9. Nolan, L.K., Wooley, R.E., Brown, J., Spears, K.R., Dickerson, H.W., Dekich, M. (1992) Comparison of complement resistance test, a chicken embryo lethality test and the chicken lethality test for determining virulence of avian *Escherichia coli*. Avian Dis. 36: 395-397.
10. Panigrahy, B., Yushen, L. (1990) Differentiation of pathogenic and nonapthogenic *Escherichia coli* isolated from poultry. Avian Dis. 34: 941-943.
11. Peighambari, S.M., Gyles, C.L. (1998) Construction and characterization of avian *Escherichia coli* delta *cya* delta *crp* mutants. Avian Dis. 42: 698 710.
12. Pfaff-McDonough, S.J., Home, S.M., Giddings, C.W., Ebert, J.P., Doetkott, C., Smith, M.H., et al. (2002) Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. Avian Dis. 44: 23-33.
13. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, Q.R. (1994) Clinical Veterinary Microbiology, Wolf Publishing. London, UK.
14. Shane, S.M. (2001) Coliform infections are responsible for heavy losses, part one. World Poult. 17: 58-59.
15. Silveira, W.D., Ferreira, A., Brocchi, M., Hoilanda, L.M., Castro, A.F.P., Yamda, A.T., et al. (2002) Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. Vet Microbiol. 85: 47-53.
16. Wary, C., Davies, R.H. (2002) Colibacillosis. In: Poultry Disease. Jordan, F.T.W., Pattison, M., Alexander, D., Foragher, T. (eds.). (5th ed.). W.B. Saunders Company. Philadelphia, PA, USA. p. 125-130.
17. Wooley, R.E., Gibbs, P.S., Brown, T.P., Maurer, J.J. (2000) Chicken embryo lethality assay for determining the virulence of avian *Escherichia coli* isolates. Avian Dis. 44: 318-324.
18. Wooley, R.E., Brown, J., Gibbs, P.S., Nolan, L.K., Turner, K.S. (1993) Effect of normal intestinal flora

of chickens on colonization by virulent colic V-producing, avirulent, and mutant colicin V-producing avian *Escherichia coli*. Avian Dis. 37: 1092-1096.

19. Wooley, R.E., Nolan, L.K., Brown, J., Gibbs, P.S., Giddings, C.W., Turner, K.S. (1993) Association of K-1 capsul, smooth lipopolysaccharids, extra T gene, and colicin V production with complement resistance and virulence of avian *Escherichia coli*. Avian Dis. 37: 1092-1096.
20. Wooley, R.E., Spears, K.R., Brown, J., Nolan, L.K., Fletcher, O.S. (1992) Relation of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. Avian Dis. 36: 679-684.
21. Zahraei Salehi, T., Yahya Raeyat, R. (2001) Serotyping of isolated *Escherichia coli* from poultry in Tehran province. J Vet Res. 56: 17-20.

Virulence determination of Iranian *Escherichia coli* isolates from poultry in day-old chicks using a lethality test

Payervand, S., Peighambari, S. M.*, Shojadoost, B.

Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran

(Received 16 January 2013 , Accepted 23 April 2013)

Abstract:

BACKGROUND: Colibacillosis due to *Escherichia coli* is one of the most important infectious diseases in poultry. While the influence of *E. coli* virulence factor in birds may differ due to interactions with other influential factors, the sole presence of such factors in *E. coli* does not determine its pathogenicity. Therefore, it is necessary to test the pathogenic capability of *E. coli* isolates on susceptible birds. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was to determine the virulence of three *E. coli* isolates from colibacillosis and compare their effects on day-old chicks using a lethality test. **METHODS:** Seventy 1-day-old chicks were divided into 3 treatment groups of 20 chicks and 2 control groups of 5 chicks. Each treatment group was assigned to one *E. coli* isolate and divided into 4 sub-groups of 5 chicks. The overnight broth culture of each *E. coli* isolate was washed with PBS three times and diluted. Then, 0.5 ml of undiluted culture (~10^9 CFU/mL), and the dilutions of 0.1, 0.01, and 0.001 of each culture were injected subcutaneously to each of the 5 birds in each subgroup behind the neck. One group of 5 birds was injected by PBS while negative control group did not receive anything. The chicks were monitored every 12 hours for 6 days. The dead chicks during the course of the experiment and all survived ones were necropsied and samples were taken from hearts and livers for bacteriological culture. Virulence of each *E. coli* isolate was evaluated based on a scoring system developed on death time, gross pathological observations, and bacteriological findings. **RESULTS:** All *E. coli* isolates of this study were capable of causing mortalities and producing the lesions typical of colibacillosis. There were no significant differences among the three *E. coli* isolates in their in vivo virulence abilities but the difference between each of the three *E. coli* isolates and each of the two control groups was significant ($p \leq 0.05$). **CONCLUSIONS:** This study determined that our *E. coli* isolates were able to cause mortalities in day-old chicks. These findings increased our knowledge on the virulence characteristics of three Iranian *E. coli* isolates originated from avian colibacillosis.

Key words: *Escherichia coli*, virulence, lethality test, day-old chick model

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The scoring system used in this study. Each chick that died during the experiment received score 4. Moreover, the death time score for each chick was also added to score 4 of dead chicks. Six days after challenge, survived chicks were euthanized, necropsied, and scored based on criteria mentioned in this table. Maximum group (including 5 chicks) score was 40 (100%).

Table 2. Mortalities observed in experiment groups during the 6 days post challenge (5 chicks in each group). (1) Original suspension contained 10^9 CFU/mL bacteria that was diluted 1:10 three times.

Table 3. Mortalities and death time in group of chicks challenged with EC12 strain during the 6 days post challenge (5 chicks in each group).

Table 4. Mortalities and death time in group of chicks challenged with EC50 strain during the 6 days post challenge (5 chicks in each group).

Table 5. Mortalities and death time in group of chicks challenged with EC71 strain during the 6 days post challenge (5 chicks in each group).

Table 6. Comparison of virulence study results among three *Escherichia coli* isolates in day-old chicks. (1) Scoring system (refer to Table1). Three *E. coli* isolates were compared with each other in identical dilutions and with two control groups. Values with different superscripts in an identical dilution and in two control groups differ significantly ($p \leq 0.05$). (2) Negative control group included chicks that received neither bacteria nor PBS.

***Corresponding author's email: mpeigham@ut.ac.ir, Tel:021-61117150, Fax:021-66933222**