دانشگاه پیام نور

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد

رشته بیوشیمی

گروه زیست شناسی

عنوان پایان نامه:

مطالعه فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌های اشریشیاکلی طیور از نظر دارا بودن سیستم آئروباکتین

اعظم یزدانی

اساتید راهنما:دکتر سید مصطفی پیغمبری

دکتر سید کاظم بیدکی

اردیبهشت ۱۳۹۲

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه پیام نور

دانشکده علوم پایه

مرکز تهران شرق

پایان نامه

برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد

رشته بیوشیمی

گروه زیست شناسی

عنوان پایان نامه:

مطالعه فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌های اشریشیاکلی طیور از نظر دارا بودن سیستم آئروباکتین

اعظم یزدانی

اساتید راهنما: سید مصطفی پیغمبری

سید کاظم بیدکی

اردیبهشت۱۳۹۲

اینجانب اعظم یزدانی دانشجوی ورودی سال ۱۳۸۸ مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی گواهی می نمایم چنانچه در پایان نامه خود از فکر، ایده و نوشته دیگری بهره گرفته ام با نقل قول مستقیم یا غیر مستقیم منبع و مأخذ آن رانیز در جای مناسب ذکر کرده ام. بدیهی است مسئولیت تمامی مطالبی که نقل قول دیگران نباشد بر عهده خویش می دانم و جوابگوی آن خواهم بود.

اعظم یزدانی

تاریخ و امضاء

اینجانب اعظم یزدانی دانشجوی ورودی سال ۱۳۸۸ مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی گواهی می نمایم چنانچه بر اساس مطالب پایان نامه خود اقدام به انتشار مقاله، کتاب و ... نمایم ضمن مطلع نمودن استاد راهنما، با نظر ایشان نسبت به نشر مقاله، کتاب و ... و به صورت مشترک و با ذکر نام استاد راهنما مبادرت نمایم.

اعظم یزدانی

تاریخ و امضاء

کلیه حقوق مادی مترتب از نتایج مطالعات، آزمایشات و نوآوری ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه پیام نور می باشد.

اردیبهشت ۱۳۹۲

سپاس

سپاس خدای را که هرچه دارم از اوست

سپاس او را که بی نام و یادش نمی توان آغاز کرد و نمی توان به پایان برد

به امید آنکه توفیق یابم جز در خدمت به خلق او نکوشم

تقدیم به

پدرم، خورشید روشنی بخش جان

مادرم، معلم مهربانی و ایثار

همسرم، همدل همیشه همراه

و باران نازنین، تمامی وجودم

که آسایش آنان همواره آرامش من است، همیشه دوستشان خواهم داشت

و افتخار وجود چنین عزیزانی برایم از هر مدرکی بالاتر است

تشکر و قدردانی از

آزاد مردانی که نیک می اندیشند و عقل و منطق را پیشه خود نموده اند،

استاد بزرگوار و فرهیخته جناب آقای دکتر سید مصطفی پیغمبری که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده گرفتند؛ شاگردی ایشان همواره افتخار من است.

استاد فرزانه جناب آقای دکتر سید کاظم بیدکی که از محضر پر فیض تدریسشان، بهره ها برده ام و با نکته های ظریف راهنما و راه گشایم در اکمال پایان نامه بوده اند.

و با تشکر خالصانه از تمام کسانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این مهم یاری نموده اند.

چکیده:

هدف از این تحقیق شناسایی سیستم آئروباکتین در جدایه‌های *E.coli* از موارد کلی باسیلوز طیور، مقایسه ژنوتیپ و فنوتیپ هر جدایه و میزان فراوانی آن به عنوان یکی از عوامل حدت در آن‌ها بود. به همین منظور ۵۰ جدایه *E. coli* از جراحات پریکاردیت جوجه‌های گوشتی تلف شده از بیماری کلی باسیلوز متعلق به ۲۰ مرغداری گوشتی در استان های تهران، البرز و قزوین جمع آوری گردید و از نظر توانایی تولید آئروباکتین و وجود ژن *iucD* مورد آزمایش قرار گرفت. در بررسی فنوتیپی، توانایی تولید آئروباکتین توسط ۵۰ جدایه *E.coli* مورد مطالعه بر اساس روش تشریح شده در منابع تعیین گردید. نتایج آزمایشات نشان داد در بین جدایه‌های *E.coli*، ۸۶٪ توانایی تولید آئروباکتین را داشتند. در بررسی ژنوتیپی، از روش PCR (واکنش زنجیره‌ای پلی مراز) به عنوان روش مولکولی برای شناسایی ژن *iucD* استفاده گردید. در ۹۶٪ جدایه‌ها ژن *iucD* شناسایی شد و در دو جدایه که از نظر فنوتیپی نیز منفی بودند ژن آئروباکتین (*iucD*) شناسایی نشد. یافته‌های مطالعه حاضر همچون پژوهش های قبلی، بر وجود یک ارتباط قوی بین تولید آئروباکتین و میزان حدت در سویه‌های *E.coli* طیور دلالت دارد.

فهرست

فصل اول : پیشگفتار.....۱

فصل دوم : مروری برمنابع.....۵

۲-۱ خانواده انترو باکتریاسه.....٦

۲-۲ گونه اشریشیاکلی.....۸

۲-۳ بیماری‌های ناشی از عفونت با اشریشیاکلی در پرندگان..... ۱۲

۲-۳-۱عفونت کیسه زرده و ورم ناف ۱۲

۲-۳-۲ عفونت دستگاه تنفسی..... ۱٤

۲-۳-۳ سپتی سمی حاد.....۱۷

۲-۳-٤ پریکاردیت..... ۱۸

۲-۳-۵ سلولیت طیور..... ۱۸

۲-۳-٦ سندرم کله بادی (SHS) ۱۹

۲-۳-۷ تورم ملتحمه چشم و تورم چشم..... ۲۱

۲-۳-۸ تورم روده.....۲۲

۲-۳-۹ کلی گرانولوما.....۲۳

۲-۳-۱۰ تورم غشاء سینوویال و تورم استخوان.....۲٤

۲-۳-۱۱ التهاب لوله‌های رحمی ، پریتونیت..... ۲۵

۲-٤ عوامل حدت در اشریشیاکلی پرندگان..... ۲٦

۲-٤-۱ سیطره و چسبندگی ۲۷
۲-٤-۲ سایر لیگاندهای چسبندگی ۲۸
۲-٤-۳ تولید سموم ۲۸
۲-٤-٤ مقاومت سرمی ۲۹
۲-٤-٥ تولید همولیزین ۲۹
۲-٤-٦ تولید باکتریوسین ۳۰
۲-٤-۷ تولید سیدروفور ۳۱
۲-٤-۷-۱ انتروباکتین ۳۷
۲-٤-۷-۲ سالموکلین ۳۸
۲-٤-۷-۳ یرسیناباکتین ٤۲
۲-٤-۷-٤ آئروباکتین ٤۳
۲-٤-۷-٤-۱ سنتز آئروباکتین ٤۳
۲-٤-۷-٤-۲ جذب آئروباکتین به داخل پری‌پلاسم ٤٤
۲-٤-۷-٤-۳ درونی ساختن آئروباکتین ٤٤
۲-٤-۷-٤-٤ آزادسازی آهن از آئروباکتین ٤٥
۲-٤-۷-٤-٥ تنظیم جذب آهن توسط سیدروفور ٤٥
۲-٤-۷-٤-٦ نقش آئروباکتین در حدت E.coli ٤٦
فصل سوم: مواد و روش کار ٤۹
۳-۱ نمونه‌برداری ٥۰

۳-۲ کشت باکتری شناسی.....۵۰
۳-۳ تعیین بیوتیپ.....۵۱
۳-٤ توانایی تولید آئروباکتین.....۵۲
۳-۵ استخراج DNA.....۵٤
۳-٦ واکنش زنجیره‌ای پلی مراز.....۵۵
۳-۷ الکتروفورز فرآورده PCR.....۵٦
فصل چهارم :نتایج.....۵۸
فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری.....٦٤
منابع.....۷۳
Abstract.....۸۵

فصل اول

پیشگفتار

پیشرفت روزافزون صنعت پرورش طیور در ایران در سال‌های اخیر و گرایش به ایجاد مرغداری‌های صنعتی و بزرگ، پرندگان پرورشی را نسبت به بیماری‌های مختلف حساس‌تر نموده و مخاطرات و زیان‌های اقتصادی ناشی از بیماری‌های واگیردار را در آن‌ها افزایش داده است.

از جمله بیماری‌های واگیردار باکتریایی، کلی‌باسیلوز پرندگان می‌باشد که باکتری اشریشیاکلی[1] عامل بیماریزای اولیه یا ثانویه آن به شمار می‌رود و همه ساله خسارات مالی قابل توجهی را به صنعت پرورش طیور کشور وارد کرده است. اولین بار در سال ۱۸۹٤ میلادی شیوع کلی‌باسیلوز در ماکیان گزارش شده است. از آن پس گزارشات متعددی از کلی باسیلوز وجود داشته و تحقیقات دامنه‌داری در مورد این بیماری و عامل آن انجام گرفته است.

عده‌ای از محققان بر این باورند که نه تنها ممکن است *E. coli* به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب در پی سرکوب سیستم ایمنی میزبان و وقوع اولیه بیماری ویروسی خودنمایی کند، بلکه تعدادی از سروتیپ‌های آن به طور اولیه پاتوژن می‌باشند.

کلی‌باسیلوز در تمام انواع پرندگان و سنین مختلف و همچنین در بسیاری از پستانداران از جمله انسان بروز می‌کند. این بیماری در سراسر جهان شایع است و به عنوان یک بیماری زئونوتیک نیز مطرح می‌باشد.

کاهش سودآوری به واسطه عفونت‌های ناشی از *E. coli* می‌تواند تمام مراحل تولید از جوجه‌کشی تا فرآوری کشتارگاهی را در بر بگیرد. ارزیابی دقیق خسارات اقتصادی مرتبط با اشکال مختلف عفونت‌های

[1] *Escherichia coli* (*E. coli*)

E. coli مشکل است، چرا که تفاوت در حدت سویه‌های مختلف و تعامل این میکروارگانیسم با پاتوژن‌های دیگر و عوامل استرس‌زای محیطی در میزان تلفات تاثیرگذار هستند.

درحال حاضر روشن گردیده است که برخی از سویه‌های *E. coli* به واسطه بهره‌مندی از برخی عوامل حدت[1]، بیماریزایی بیشتری دارند. در طی سه دهه اخیر مطالعات گسترده‌ای به منظور شناسایی این عوامل و نقش آن‌ها در بیماریزایی عفونت‌های حاصل از *E. coli* طیور و سایر حیوانات انجام شده است.

در سال ۱۳۸۲ مطالعه جامعی برای تعیین ویژگی‌های *E. coli* جدا شده از کلی باسیلوز مرغداری‌های صنعتی پرورش جوجه گوشتی استان تهران انجام شد. در این راستا این پروژه تحقیقاتی با هدایت جناب آقای دکتر سید مصطفی پیغمبری، دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و جناب آقای دکتر سید کاظم بیدکی، استادیار دانشکده علوم پایه دانشگاه پیام نور به منظور بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی سیستم آئروباکتین به عنوان یکی از مهمترین عوامل حدت در اشریشیاکلی طراحی و به مرحله اجرا در آمد.

هدف از این بررسی شناسایی سیستم آئروباکتین در جدایه‌های *E. coli* از موارد کلی باسیلوز طیور در مرغداری‌های صنعتی پرورش جوجه گوشتی در استان های تهران، البرز و قزوین ، مقایسه ژنوتیپ و فنوتیپ هر جدایه و میزان فراوانی آن به عنوان یکی از عوامل حدت در آن‌ها می‌باشد.

[1] Virulence factors

امید است اطلاعات کسب شده از این تحقیق راه‌گشای مطالعات آتی اپیدمیولوژیک و بررسی تکمیلی ژنوتیپی دیگر عوامل حدت این میکروارگانیسم و آشنایی بیشتر با مکانیسم‌های بیماریزایی سویه‌های وحشی و احتمالا انتخاب سویه‌های مناسب به عنوان واکسن و تولید آنتی بیوتیک‌های جدید باشد.

اعظم یزدانی

زمستان ۹۱

فصل دوم

مروری بر منابع

۲-۱ خانواده آنتروباکتریاسه

خانواده آنتروباکتریاسه[1] مشتمل بر باکتری‌های گرم منفی، میله‌ای شکل، هوازی یا بی‌هوازی اختیاری و غیرهاگ‌زا می‌باشند. گونه‌های متحرک این خانواده تاژک‌های اطرافی[2] دارند. این اجرام بیشتر در روده مهره داران به عنوان فلور طبیعی، فرصت طلب یا پاتوژن حضور دارند. اغلب باکتری‌های این خانواده به دلیل زندگی در روده انسان و حیوانات در اکثر منابع میکروب‌شناسی تحت عنوان "باسیل‌های روده‌ای"[3] مورد بررسی قرار می‌گیرند. برخی از گونه‌های این خانواده پاتوژن روده‌ای نبوده بلکه اجرام فرصت طلبی هستند که قادرند در دستگاه‌های ادراری، تنفسی، گردش خون و اعصاب میزبان‌های مختلف به خصوص در شرایط تضعیف سیستم ایمنی، عفونت‌زایی نمایند. بعضی از اعضای این خانواده همچون سالمونلا، شیگلا و تعدادی از سویه‌های *E. coli* هم می‌توانند به صورت اولیه برای انسان و حیوانات، بیماری‌زا باشند (Collee *et al*. 1990, Quinn *et al*. 1994).

در بین اعضاء این خانواده واریانت‌های غیرمتحرک مانند شیگلا و کلبسیلا نیز به چشم می‌خورد. این باکتری‌ها ممکن است علاوه بر تاژک، کپسول، فیمبریه[4] و یا هر دو را داشته باشند. جدار باکتری‌های این خانواده مشابه جدار باکتری‌های گرم منفی است. اغلب اعضای این خانواده به طور متوسط ۶-۱ میکرون طول و ۱-۰/۳ میکرون عرض دارند (Collee *et al*. 1990, Quinn *et al*. 2002).

[1] *Enterobacteriaceae*
[2] Peritrichous flagella
[3] Enteric bacilli
[4] Fimbriae

باکتری‌های این خانواده به راحتی بر روی محیط‌های معمولی کشت آزمایشگاهی رشد می‌کنند و محیط‌های انتخابی و افتراقی متعددی برای جداسازی آن‌ها وجود دارد. اما روش اصلی جهت تمایز آن‌ها بر اساس روش‌های بیوشیمیایی می‌باشد.

فعالیت اکسیداز در آن‌ها وجود ندارد و به جز شیگلا دیستانتریه همگی کاتالاز منفی می‌باشند، نیترات را به نیتریت احیا می‌کنند. گونه‌های مختلف از نظر توان تخمیر کربوهیدرات‌ها متفاوتند و محصولات نهایی متنوعی را ممکن است فراهم آورند. جنس‌های خانواده آنتروباکتریاسه بر اساس تخمیر قند لاکتوز به دو دسته تقسیم می‌شوند. بر اساس این گروه‌بندی جنس‌های اشریشیا، کلبسیلا و آنتروباکتر در گروه لاکتوز مثبت‌ها و جنس‌های سالمونلا، شیگلا، پروتئوس، یرسینیا و بعضی دیگر در گروه لاکتوز منفی‌ها هستند. اعضای این خانواده در شرایط هوازی از چرخه تری کربوکسیلیک اسید و زنجیره انتقال الکترون و به هنگام عدم دسترسی به اکسیژن از طریق تخمیر کربوهیدرات‌ها تامین انرژی می‌نمایند (Collee *et al.* 1990, Quinn *et al.* 2002).

جنس‌های مختلف خانواده آنتروباکتریاسه دارای پادگن‌های مختلفی هستند که سه گروه پادگن پیکری یا سوماتیک (O)، پادگن تاژک (H) و پادگن کپسول (K) قرار می‌گیرند و در سروتایپینگ از آن‌ها استفاده می‌شود. همچنین پادگنی به نام پادگن مشترک روده‌ای[1] در بین این باکتری‌ها شناسایی شده‌اند که بر روی سطح خارجی باکتری قرار دارند. این آنتی‌ژن‌ها در مطالعات تاکسونومی و اپیدمیولوژی کاربرد دارند اما در تشخیص‌های روزمره باکتریولوژی بکار برده نمی‌شوند (Baron and Finegold 1990).

[1] Enteric common antigen

لازم به ذکر است که اصطلاح کلی‌فرم اهمیت طبقه‌بندی ندارد ولی برای اعضاء خانواده آنتروباکتریاسه که معمولا لاکتوز را تخمیر می‌کنند، نظیر اشریشیاکلی، کلبسیلا، گونه‌های آنتروباکتر و غیره به کار برده می‌شود (Baron and Finegold 1990).

۲-۲ گونه اشریشیاکلی

اشریشیاکلی باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، تاژکدار به طول ۲ تا ۳ میکرون و عرض ۰/۵ تا ۰/٦ میکرون می‌باشد. هاگ تولید نمی‌کند، برخی سویه‌ها کپسول دارند، به واسطه داشتن تاژک‌های اطرافی بعضی متحرکند و بسیاری از سویه‌های *E. coli* فیمبریه تیپ I را دارا هستند. باکتری هوازی- بی‌هوازی اختیاری است. درجه حرارت مناسب برای رشد این میکروب ۳۷ درجه سانتی‌گراد است ولی قادر به رشد در حرارت ٤٤-۱۸ درجه سانتی‌گراد نیز می‌باشد. بر روی محیط‌های مغذی معمولی به خوبی رشد می‌کند و پرگنه‌هایی به قطر یک تا سه میلی‌متر تشکیل می‌دهد. بر اساس میزان لیپوپلی‌ساکارید لایه خارجی باکتری، کلنی سویه‌های *E. coli* به دو شکل صاف[1] و خشن[2] دیده می‌شوند. در سویه‌هایی که اشکال خشن دارند، زنجیره‌های جانبی پلی‌ساکاریدی در اثر جهش از بین رفته‌اند. سویه‌های صاف بر روی محیط‌های کشت جامد، پرگنه‌های صاف، درخشنده و شفاف و سویه‌های خشن، پرگنه‌های خشک و چروک خورده با کناره‌های مضرس ایجاد می‌نمایند. سویه‌های کپسول‌دار هم پرگنه‌های موکوئیدی بر روی محیط کشت‌های جامد تولید می‌کنند (Quinn *et al*. 1994, Hirsh 1999, Barnes *et al*. 2003).

[1] Smooth
[2] Rough

برخی از سویه‌های *E. coli* به واسطه تولید همولیزین بر روی ژلوز خوندار، هاله‌ای از همولیز کامل به وجود می‌آورند. اکثر سویه‌های *E. coli* لاکتوز را به سرعت تخمیر می‌کنند، اما برخی با تآنی این عمل را انجام می‌دهند. در حال حاضر به وسیله آزمایش ONPG[1] می‌توان آن‌ها را تشخیص داد. با این آزمایش باکتری‌هایی که دارای آنزیم بتاگالاکتوزیداز[2] برای تخمیر کند لاکتوز می‌باشند، شناسایی می‌شوند (Prescott *et al*. 2002).

اشریشیاکلی با تخمیر گلوکوز، مالتوز، مانیتول، گزیلوز، گلیسرول، رامنوز، سوربیتول و آرابینوز، اسید و گاز تولید می‌کند ولی در تخمیر دکسترین، نشاسته و اینوزیتول این مواد را تولید نمی‌نماید. اشریشیاکلی ژلاتین را ذوب و نیترات را به شدت به نیتریت احیاء می‌کند. در این باکتری تولید اندول[3] و واکنش متیل رد[4] مثبت، اما آزمون اکسیداز، مصرف نیترات، واکنش وژز پروسکوئر[5] و هیدرولیز اوره منفی است. لازم به ذکر است که خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌های *E. coli* پرندگان مشابه با سویه‌های *E. coli* سایر حیوانات است (Baron and Finegold 1990, Quinn *et al*. 1994, Foley *et al*. 2000).

اشریشیاکلی هفته‌ها بلکه ماه‌ها در شرایط طبیعی، در آب، مدفوع و گردوغبار محل نگهداری پرنده زنده می‌ماند. این باکتری معمولا حرارت ۶۰ درجه سانتیگراد را نیم ساعت تحمل می‌کند ولی اکثر آن‌ها پس از ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در این حرارت می‌میرند (Baron and Finegold 1990, Quinn *et al.* 1994, Foley *et al.* 2000).

[1] O-nitrophenyl-Beta-glucuronide
[2] Beta-Galactosidase
[3] Indol
[4] Methyl red
[5] Voges proskauer