شناسایی برخی از عوامل حدت جدایه های *اشریشیا کلی* از موارد کلی باسیلوز طیور

دکتر پیام حقیقی خوشخو[1] دکتر سید مصطفی پیغمبری[1*]

دریافت مقاله: ۴ دی ماه ۱۳۸۲
پذیرش نهایی: ۱۶ اسفند ماه ۱۳۸۲

هدف: تعیین میزان فراوانی برخی از عوامل بالقوه حدت در جدایه های *Escherichia coli* از موارد کلی باسیلوز طیور.

طرح: بررسی توصیفی.

نمونه ها: یکصد جدایه *E. coli* از موارد کلی باسیلوز موجود در گنجینه باکتریایی آزمایشگاه تحقیقاتی بخش بیماریهای طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران مورد استفاده قرار گرفت.

روش: تمام جدایه های مورد مطالعه از نظر قدرت تحرک، مقاومت سرمی و توانایی تولید همولیزین، آئروباکتین، کلی سین و کلی سینV آزمایش شدند.

نتایج : از صد جدایه *E. coli* مورد بررسی ۶۴ درصد متحرک، ۹۴ درصد مقاوم به اثر باکتریسیدال سرم، و ۱۰۰ درصد غیرهمولیتیک بودند و به ترتیب ۸۵ درصد، ۹۰ درصد و ۲۲ درصد جدایه ها توانایی تولید آئروباکتین، کلی سین و فقط کلی سین Vرا داشتند.

نتیجه گیری: تنوع در عوامل حدت، در بین جدایه های مورد بررسی مشاهده شد. اکثریت این جدایه ها واجد عوامل حدت مورد مطالعه بودند. تولید آئروباکتین، کلی سین و مقاومت سرمی سه ویژگی مهم در سویه های *E. coli* جدا شده از کلی باسیلوز طیور می باشند. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۳)، دوره ۵۹، شماره ۳، ۲۴۰-۲۳۳.

واژه های کلیدی : *اشریشیا کلی*، کلی باسیلوز، آئروباکتین، کلی سین، مقاومت سرمی.

Characteristics of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis

Khoshkhoo, P. H.,[1] Peighambari, S. M.[1]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

Objective: To determine the frequency of potential virulence factors in *Escherichia coli* isolates from avian colibacillosis.

Design: Descriptive study.

Samples: One hundred *E. coli* isolates from cases of avian colibacillosis examined in this study, were obtained from the bacterial collection of Poultry Diseases Section, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran.

Procedure: All isolates were characterized with respect to motility, serum resistance and ability to produce aerobactin, colicin, colicin V and hemolysin.

Results: No hemolytic isolate was found. Motility and serum resistance were found in 64 and 94% of isolates, respectively. The percentages of isolates that produced aerobactin, colicin and colicin V were 85, 90 and 22%, respectively.

Conclusion: Aerobactin production and serum resistance may be important factors associated with virulence of avian *E. coli* isolates.

J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 59, 3: 233-240, 2004.

Key words: *Escherichia coli*, Colibacillosis, Aerobactin, Serum resistance, Colicin.

Corresponding author's email:mpeigham@ut.ac.ir

اشریشیا کلی جزء فلور طبیعی روده انسان، پستانداران و پرندگان است و لیکن برخی از سویه های آن قادرند که در انسان و حیوانات عفونتهای گوناگون گوارشی و غیرگوارشی را ایجاد نمایند (۴). در پرندگان عفونتهای *اشریشیا کلی* موجب تظاهرات بالینی مختلفی می گردند که معمولترین شکل آن کلی سپتی سمی می باشد که همه ساله خسارات اقتصادی فراوانی را به صنعت طیور وارد می سازد (۴۹،۲۱).

دسته ای از جدایه های *E. coli* به واسطه اکتساب برخی از عوامل حدت (Virulence factors) بیماریزایی بیشتری دارند. محققین از خصوصیاتی مانند توانایی چسبندگی به مخاطات (۳،۶)، مقاومت در برابر اثرات باکتریسیدال سیستم مکمل (۱،۳۰،۴۸)، توانایی جذب آهن در محیط های فقیر از آهن (۲۶،۳۳)، تولید کپسول پلی ساکاریدی K1 (۲۵،۲۷)، تولید انواع سیتوتوکسین (۱۰،۴۱)، توانایی حرکت (۲،۵)، داشتن پلاسمیدهای با وزن ملکولی سنگین (۲۰،۳۷) و تولید همولیزین (۱۹،۴۸) که به طور بالقوه می توانند به عنوان عوامل حدت *E. coli* طیور مطرح باشند، نام برده اند. از سویی دیگر امروزه کنترل کلی باسیلوز طیور از آن رو مشکل می باشد که آزمون تشخیصی و تفریقی آسان، ارزان و سریع در تمایز جدایه های پاتوژن اولیه (خیلی حاد)، پاتوژن ثانویه (با حدت متوسط) و غیرپاتوژن (غیرحاد) آن در دسترس نمی باشد (۴۶) بنابراین بی تردید شناخت مکانیسم های حدت در سویه های *E. coli* به طور قابل توجهی شیوه های کنترل این بیماری را بهبود خواهد بخشید (۱۴).

هدف از مطالعه حاضر، شناسایی برخی از عوامل حدت در جدایه های *E. coli* از موارد کلی باسیلوز جوجه های گوشتی و تعیین میزان فراوانی این عوامل در جدایه های فوق می باشد. این پژوهش نخستین از نوع خود در کشور در خصوص آن دسته از فاکتورهای حدت *E. coli* است که موضوع این تحقیق بوده اند.

مواد و روش کار

سویه های باکتریایی: یکصد جدایه *E. coli* مورد مطالعه در این طرح از گنجینه باکتریایی آزمایشگاه تحقیقاتی بخش بیماریهای طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انتخاب شدند. این ۱۰۰ جدایه از ضایعات پریکاردیت

۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسئول mpeigham@ut.ac.ir

جوجه های گوشتی مبتلا به کلی باسیلوز مربوط به ۲۰ مرغداری اطراف تهران در سال ۱۳۸۰ (با توزیع ۵ نمونه از هر مرغداری) جدا شده بودند.

توانایی حرکت: جدایه های *E. coli* در لوله آزمایش حاوی محیط حرکت (Bio Quest, USA) با آنس پلاتین نوک تیز به روش عمقی (Stab) کشت و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند (۳۴). پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون توانایی حرکت باکتری های مورد آزمایش بررسی شدند. در صورتی که نمونه مورد آزمایش فقط در طول خط تلقیح رشد یافته بود غیرمتحرک و هنگامی که سویه باکتریایی علاوه بر طول خط تلقیح، در اطراف آن نیز به صورت منتشر رشد یافته بود متحرک قلمداد گردید.

تولید همولیزین: به منظور مشاهده فعالیت همولیتیک نمونه ها، جدایه های *E. coli* مورد آزمایش بر روی محیط آگار خوندار گوسفند (Difco, USA) به روش تلقیح نقطه ای (Spot inoculation) کشت و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون، از نظر ایجاد همولیز مورد مشاهده قرار گرفتند (۳۴).

تولید آئروباکتین: توانایی تولید آئروباکتین توسط جدایه های *E. coli* مورد مطالعه براساس روش Peighambari و همکاران تعیین گردید (۲۹). سه سویه *E. coli* (اهدا شده توسط Gyles, University of Guelph, Canada Dr. C. L.) که برای انجام این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند عبارت بودند از: سویه K-12 LG1522 که واجد کلیه ژن های کارآمد در سیستم انتقال آهن آئروباکتین می باشد اما فاقد توانایی بیوسنتز آئروباکتین است (سویه اندیکاتور)، سویه VW187 که تولید کننده سیستم آئروباکتین می باشد (کنترل مثبت) و سویه RS218 که سیستم تولید آئروباکتین را در اختیار ندارد (کنترل منفی). ابتدا یک کلنی از سویه K-12 LG1522 *E. coli* به ۵ میلی لیتر محیط مایع CM9 (۲۹) افزوده شد و حدود ۶ ساعت در شیکرانکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا ("Optical Density "OD) آن به ۰/۵۴ تا ۰/۵۶ رسید. سپس یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی محیط CM9 به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ (Sigma 3-10, Germany) شد. سپس، بعد از دور ریختن مایع رویی، سلولهای ته نشین شده در ته میکروتیوب پنج مرتبه با محیط مایع (Sigma Chemical Co. USA) M9 Minimal Salts شستشو داده شدند (هر بار ۲ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه). پس از آخرین شستشو، به سلولهای ته نشین شده در ته میکروتیوب مجدداً یک میلی لیتر محیط مایع M9 Miminal Salts افزوده شد و از آن رقت 10^{-3} تهیه شد. یک میلی لیتر از این رقت را با ۴ میلی لیتر آگاروز ۰/۷ درصد (Bio-Rad Laboratories, Canada) ذوب شده (۴۳ تا ۴۵ درجه سانتیگراد) حاوی (Sigma Chemical Co.) 200μM Dipyridyl مخلوط کرده و سریعاً به طور یکنواخت برروی پلیت CM9 آگار (۲۹) حاوی 200 μM Dipyridyl اضافه گردید. پلیت ها به مدت ۲۰ دقیقه به منظور سفت شدن آگاروز نرم در درجه حرارت آزمایشگاه نگهداری شدند و سپس به وسیله خلال دندان (Toothpick) استریل سویه های *E. coli* کنترل مثبت و کنترل منفی به همراه شش جدایه *E. coli* تحت آزمایش که روز قبل برروی محیط مک کانکی رشد داده شده بودند برروی این پلیت ها به صورت نقطه ای کشت داده شدند. پس از ۱۴-۱۲ ساعت نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد، پلیت ها مورد مشاهده قرار گرفتند. تشکیل هاله ای از رشد سویه LG1522 K-12 اطراف کشت نقطه ای هر جدایه به مفهوم توانایی تولید آئروباکتین توسط جدایه *E. coli* مورد آزمایش قلمداد گردید.

تولید کلی سین: آزمایش توانایی تولید کلی سین توسط جدایه های *E. coli* مورد مطالعه بنا به روش توصیه شده Fantinatti و همکاران صورت گرفت (۱۱). برای انجام این آزمایش سویه های *اشریشیاکلی* WG541 (به عنوان سویه کنترل مثبت) و K-12 711 (به عنوان سویه اندیکاتور و کنترل منفی) مورد استفاده قرار گرفتند که هر دو سویه توسط Dr. C. L. Gyles اهدا گردیدند. تعداد هشت جدایه *E. coli* مورد مطالعه و سویه های کنترل مثبت و کنترل منفی که روز قبل از این آزمایش برروی محیط مک کانکی رشد یافته بودند توسط خلال دندان استریل برروی یک پلیت (Merck) ("Tryptic Soy Agar "TSA) به صورت نقطه ای کشت شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرارداده شدند. باکتری های رشدکرده برروی TSA به مدت ۳۰دقیقه در معرض بخار کلروفرم قرار گرفته و کشته شدند. سپس سطح هر پلیت TSA به طور یکنواخت توسط مخلوطی از سویه اندیکاتور K-12 711 و TSA نرم (دارای آگار به میزان ۰/۷ درصد) پوشانده شد. به منظور تهیه مخلوط سویه اندیکاتور و TSA نرم ابتدا سویه K-12 711 برروی محیط آگار خوندار کشت داده شد و مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس یک کلنی از کشت حاصله به ۵ میلی لیتر محیط (Merck) ("Tryptic Soy Broth "TSB) تلقیح شد و به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در شیکرانکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از این مدت ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی حاصله به ۶ میلی لیتر TSA نرم ذوب شده (۴۳ تا ۴۵ درجه سانتیگراد) افزوده شد. این مجموعه پس از کمی به همزدن آماده اضافه شدن برروی پلیت TSA بود. پلیت های TSA که سطح آنها توسط مخلوط درست شده پوشانده شده بودند به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. وجود منطقه شفاف (Clear zone) و عاری از رشد سویه اندیکاتور اطراف هر جدایه *E. coli* به عنوان توانایی تولید کلی سین توسط آن جدایه *E. coli* تلقی گردید.

تولید کلی سین V: همه جدایه های *E. coli* مورد آزمایش که از نظر تولید کلی سین مثبت بودند برای تعیین توانایی تولید کلی سین V نیز به روش Davies و همکاران مورد آزمایش قرار گرفتند(۸) . روش انجام این آزمایش مشابه روش آزمایش تولید کلی سین است با این تفاوت که سویه اندیکاتور آن سویه *E. coli* LG1522 K-12 می باشد که دارای پلاسمید Col V است. این سویه چون خود تولیدکننده کلی سین V است نسبت به اثرات کشندگی کلی سین V مقاوم می باشد. در این آزمایش هر کدام از جدایه های *E. coli* که قادر به مهار رشد باکتری اندیکاتور نبود به عنوان جدایه ای تلقی شد که

فقط کلی سین V تولید می نماید ولی جدایه ای که قادر به مهار رشد باکتری اندیکاتور بود به عنوان جدایه ای تلقی شد که تولیدکننده توأم کلی سین V و سایر کلی سین ها و یا فقط تولیدکننده سایر کلی سین ها بود. سویه های *اشریشیاکلی* B188 Col V^+ و B188 Col V^- (اهدا شده توسط Dr. C.L. Gyles) به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی در این آزمایش بر روی هر پلیت مورد استفاده قرار گرفتند.

مقاومت به اثر باکتریسیدال سرم: آزمایش تعیین مقاومت جدایه های *E. coli* علیه فعالیت کشندگی سرم به روش Taylor انجام گرفت (۴۲). در این روش از بافر ویژه ای به نام Gelatin-Veronal buffered saline به اضافه یون های Mg^{2+} و Ca^{2+} (GVB^{2+}, pH=7.35) استفاده شد. جهت تهیه این بافر ابتدا یک گرم ژلاتین (Difco) در ۶۰۰ میلی لیتر آب گرم حل شده و پس از خنک شدن، ۲۰۰ میلی لیتر محلول Veronal (5X) و یک میلی لیتر محلول ذخیره فلزی (Stock metals) به آن افزوده و حجم نهایی با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد. سپس این بافر با عبور دادن از فیلتر نیتروسلولزی (0.25 µm) استریل گردید. برای تهیه محلول Veronal (5X)، ۴۱/۲ گرم NaCl (Merck) و ۵/۰۹۵ گرم Sodium 5, 5- diethyl barbiturate (Merck) به ۷۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد و سپس با 1M HCl، pH= ۷/۳۵ به دست آمد و حجم این محلول با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد. جهت فرآوری محلول ذخیره فلزی ۲/۰۳۳۱ گرم (Merck) 2M $MgCl_2$ و ۰/۱۶۶۴۸۹۵ گرم (Merck) 0.3 M $CaCl_2$ در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شدند. در این آزمایش از دو سویه *اشریشیاکلی* به نامهای 3774 و 2030 (اهدا شده توسط Dr. C. L. Gyles) به ترتیب به عنوان سویه های کنترل مثبت (مقاوم به اثرات کشندگی سرم) و کنترل منفی (حساس به کشندگی سرم) استفاده شد. سرم تازه موردنیاز این آزمایش از خون ورید بالی جوجه های سالم ۴هفته وغیرایمن جمع آوری شد.

برای انجام آزمایش، نخست جدایه *E. coli* مورد بررسی به محیط TSB تلقیح گردید و به مدت ۱۸ ساعت در شیکرانکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی حاصله به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و سپس بعد از دور ریختن مایع رویی، سلولهای ته نشین شده در ته میکروتیوب دو بار با بافر GVB^{2+} شسته شدند. پس از آخرین عمل شستشو، به سلولهای ته نشین شده مجدداً بافر GVB^{2+} افزوده شد تا غلظتی برابر با 10^6CFU/ml از باکتری ها حاصل شود. میزان ۰/۱ میلی لیتر از این سوسپانسیون باکتریایی به ۰/۲ میلی لیتر سرم جوجه سالم اضافه شد و در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. یکصد میکرولیتر از مخلوط فوق در مراحل مختلف قبل از انکوبه کردن، یک و سه ساعت پس از انکوباسیون برروی محیط مک کانکی اضافه شده و به روش گسترش سطحی (Spread-Plate) کشت داده شدند. این پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و پس از این مدت شمارش کلنی انجام شد. مبنای منفی بودن آزمایش (حساس به اثر کشندگی سرم) کاهش تعداد باکتری ها در شمارش کلنی پلیت های کشت شده در زمانهای متوالی به میزان 2 log بود.

نتایج

از ۱۰۰ جدایه *E. coli* از کلی باسیلوز طیور (از ۲۰ مرغداری) ۶۴ درصد متحرک و ۱۰۰ درصد غیرهمولتیک بودند. همچنین در ۸۵ درصد از جدایه ها سیستم آئروباکتین مورد شناسائی قرار گرفت. آزمایشات مربوط کلی سین مشخص نمود که ۹۰ درصد جدایه ها تولیدکننده کلی سین و ۲۲ درصد هم فقط تولیدکننده کلی سین V (به عنوان تنها نوع کلی سین تولیدی) بودند. مقاومت به اثرات باکتریسیدال سرم در ۹۴ درصد جدایه ها مشاهده گردید.

بحث

اکثریت خصوصیاتی که در رابطه با حدت این باکتری توسط محققین مختلف در طی دو دهه اخیر مورد بررسی قرار گرفته است در رابطه با نوع سروگروپ O، توانایی تولید کلی سین، آئروباکتین، همولیزین، سیتوتوکسین، آندوتوکسین، دارا بودن فیمبریه، کپسول، پروتئین های غشا خارجی، قدرت تحرک، توانایی جذب رنگ کنگو قرمز، مقاومت دارویی و مقاومت سرمی بوده است (۷،۱۱،۱۶،۱۸،۲۱،۲۸،۲۹،۳۰،۳۱،۳۲،۳۹،۴۱،۴۳،۴۶). مشخص شده است که سویه های حاد *E. coli* سپتی سمیک پس از ورود به دستگاه تنفس پرنده ابتدا توسط فیمبریه به اپی تلیوم دستگاه تنفس می چسبند، متعاقباً به دلیل توانایی در مقابله با اثر باکتریسیدال سرم، همچنین رشد در محیط هایی با آهن محدود زنده مانده، تکثیر و تزاید یافته و در نهایت با ایجاد ضایعه در بافت پوششی این قسمت وارد جریان خون شده و از این رهگذر باعث سپتی سمی و مرگ می گردند (۶).

در رابطه با شناسایی عوامل حدت جدایه های *E. coli* مسبب کلی باسیلوز طیور در ایران تاکنون تحقیق جامعی انجام نشده و بیشتر مطالعات در این زمینه اختصاص به فیمبریه و نقش آن در بیماریزایی داشته است (۳۲). بدین خاطر این مطالعه به منظور شناسایی برخی از مهمترین خصوصیاتی که محققین از آنان به عنوان فاکتورهایی که به طور بالقوه می توانند در حدت جدایه های *E. coli* کلی باسیلوز طیور نقش داشته باشند، در یکی از مناطق مهم پرورش متراکم و صنعتی طیور گوشتی ایران یعنی استان تهران طراحی و برنامه ریزی شد تا نتایج حاصل برای مطالعات اپیدمیولوژیک و بررسیهای تکمیلی ژنوتیپی در آینده و اتخاذ استراتژیهای پیشگیری و درمانی مناسب براساس مکانیسم های بیماریزایی شناخته شده به کار گرفته شوند.

تحرک در بعضی باکتری ها به عنوان فاکتور حدت مطرح است (۶،۳۳) اما این مسئله در مورد *E. coli* طیور به اثبات نرسیده است. Arp و Jensen در سال ۱۹۸۰ در یک بررسی به این نتیجه رسیدند که سویه های حاد *E. coli* طیور معمولاً متحرک هستند (۳). Whittam و Wilson در سال ۱۹۸۸ در گزارشی

اعلام نموده اند که ۴۸ درصد *E. coli* جداشده از موارد کلی باسیلوز طیور متحرک بوده اند (۴۵). Wooley و همکاران در سال ۱۹۹۲ در تحقیق خود به وجود تاژک در ۱۰۰ درصد سویه های *E. coli* جداشده از کلی سپتی سمی طیور و در ۵۵ درصد سویه های *E. coli* جمع آوری شده از روده طیور سالم اشاره نموده اند (۴۸). این گروه تحقیقاتی در گزارش خود همچنین نشان دادند که ۱۰ جدایه *E. coli* از کلی سپتی سمی طیور که مقاومت سرمی بالایی داشتند ۱۰۰ درصد متحرک بودند. در حالیکه فقط ۴ درصد ۱۰ جدایه *E. coli* برگرفته از روده طیور سالم توانایی حرکت داشتند و بر این اساس نتیجه گیری نمودند که ارتباط قوی بین تحرک و حدت باکتری *E. coli* وجود دارد (۴۸). Parreira و همکاران در سال ۱۹۹۸ نیز از ۵۰ جدایه *E. coli* از سندرم کله باد (Swollen head syndrome)، ۶۲ درصد را متحرک گزارش نمودند (۲۷). در تحقیق حاضر نیز ۶۴ درصد جدایه های *E. coli* موردبررسی متحرک بودند و به مانند نتایج Rosenberger در سال ۱۹۸۵ و Parreira در سال ۱۹۹۸ هیچ رابطه ای منطقی مابین توانایی حرکت و سایر خصوصیات حدت مشاهده نشد (۲۷،۳۸). به نظر می رسد که ایجاد سویه های ایزوژنیک *اشریشیاکلی* که فقط در بیان ژنی برای تولید تاژک تفاوت داشته باشند و مقایسه آن دو در یک مدل مناسب در این مورد می تواند بسیار راه گشا باشد.

همولیزین یک ترکیب پروتئینی در برخی باکتری هاست که از طریق متلاشی نمودن گلبول های قرمز و در پی آن در اختیار قراردادن آهن گلبول های قرمز متلاشی شده به ارگانیسم بیماریزا و یا با فعالیت سیتوتوکسیک در پیشرفت بیماری ایفای نقش می نماید (۶،۴۴). امروزه آلفا همولیزین به عنوان یک عامل حدت در *E. coli* مهاجم عفونتهای غیرگوارشی انسان شناخته می شود (۲۳،۳۹). مطالعات متعدد برروی حیوانات هم این مهم را هویدا نموده که سویه های همولتیک *E. coli* بخش عمده ای از جدایه های روده ای *E. coli* را در گاو، گوسفند و خوکهای سالم تشکیل می دهند، اما در مورد طیور چنین نیست (۱۹،۳۹). گزارشات متعددی در مورد توانایی تولید همولیزین توسط جدایه های *E. coli* که باعث اسهال در گوساله، کره اسب، سگ، گربه، و خوک می شوند موجود است(۱۲،۱۳،۱۷،۳۵). گرچه تولید همولیزین توسط جدایه های *E. coli* مسبب کلی باسیلوز طیور در اکثر گزارشات نفی شده است (۱۱،۲۹،۳۶،۴۰،۴۳)، اما در بعضی گزارشات به همولیتیک بودن این جدایه ها اشاره شده است (۲۳،۳۶،۴۸). Wooley و همکاران در سال ۱۹۹۲ پس از مطالعه برروی تعیین ارتباط بین مقاومت سرمی و برخی از عوامل حدت در *E. coli* پاتوژن طیور گزارش کردند که به ترتیب۷/۵ و ۵۰ درصد جدایه های *E. coli* از موارد کلی سپتی سمی طیور بتاهمولیتیک و آلفا همولیتیک بودند در حالی که به ترتیب ۳۰ و ۵۲/۵ درصد جدایه های *E. coli* روده جوجه های سالم بتاهمولیتیک و آلفاهمولیتیک بودند که نشان دهنده درصد کمتر جدایه های همولیتیک در نزد موارد جدا شده از بیماری می باشد (۴۸). Nagai و همکاران در سال ۱۹۹۸ یک سویه پاتوژن *E. coli* طیور را تحت عنوان M1000 معرفی کردند که قادر به تولید همولیزین می باشد (۲۳). Reingold و همکاران در سال ۱۹۹۹ بیان نمودند که برخی از *اشریشیاکلی*های پاتوژن طیور واجد همولیزین می باشند و ژن کنترل کننده آن از نظر همولوژی با ژن کنترل کننده همولیزین های *E. coli* انتروهموراژیک و اوروپاتوژنیک همسان نیست (۳۶). Mellata و همکاران در سال ۲۰۰۲ در بررسی خود برروی شناسایی خصوصیات ژنوتیپی و فنوتیپی ۵۰ جدایه *E. coli* از موارد اسهال طیور متوجه شدند که تنها از این تعداد یک جدایه انتروهمولیزین و یک جدایه هم بتاهمولیزین تولید می نمایند و بقیه جدایه ها غیرهمولیتیک هستند و در نتیجه ابراز کردند که نتایج آنها نیز به مانند سایر محققین دال بر این مهم است که اکثریت جدایه های *E. coli* طیور غیرهمولیتیک می باشند (۲۲). براساس یافته های تحقیق حاضر نیز هیچ کدام از ۱۰۰ جدایه مورد آزمایش توانایی تولید همولیزین را نداشتند.

غالباً جدایه های حاد *E. coli* که بیماریهای خارج گوارشی در انسان و حیوانات تولید می کنند دارای سیستم آئروباکتین می باشند (۶،۳۳). در مورد *E. coli* جدا شده از موارد کلی باسیلوز طیور این یافته به طور برجسته ای مورد تأکید پژوهشگران مختلف قرار گرفته است (۱۶،۱۸،۲۵،۲۸،۴۱).

Peighambari و همکاران در سال ۱۹۹۵ دریافتند که ۹۰ درصد جدایه های *E. coli* مولد سلولیت طیور توانایی تولید آئروباکتین را دارا هستند در حالی که تنها ۱۶ درصد جدایه های مدفوعی *E. coli* از این توانایی برخودار بودند. آنها همچنین متوجه شدند که ۹۵ درصد سروگروپ های O1، O2، و O78 که جزء سروگروپ های حاد و رایج کلی باسیلوز طیور می باشند تولید کننده آئروباکتین بودند (۲۹). مطالعه دیگری در همین راستا، تولید آئروباکتین را در ۸۲ درصد جدایه های *E. coli* از سلولیت جوجه های گوشتی گزارش نموده است (۲۵). Parreira و همکاران در سال ۱۹۹۸ پس از بررسی عوامل حدت *E. coli* جدا شده از سندرم کله باد اعلام نمودند که ۵۶ درصد جدایه ها قادر به تولید آئروباکتین بودند (۲۸). Knoble و همکاران در سال ۲۰۰۱ در پی تحقیق خود بدین نتیجه رسیدند که ۹ جدایه *E. coli* جدا شده از دستگاه تنفس شتر مرغ توانایی رشد برروی محیط فقیر از آهن را دارند. این در حالی بود که ژن تولیدکننده آئروباکتین فقط در ۶ جدایه شناسایی شد (۱۸). Jeffrey و همکاران در سال ۲۰۰۲ ملاحظه نمودند که به ترتیب ۸۶ درصد و ۹۲ درصد جدایه های *E. coli* کلی سپتی سمی و جدایه های *E. coli* سلولیت طیور توانایی تولید آئروباکتین را دارند (۱۶). Silveria و همکاران در سال ۲۰۰۲ در تحقیقی جامع مشخص کردند که به ترتیب ۱۶/۶ درصد، ۲۷/۸ درصد، ۲۹/۱ درصد و ۷۳/۳ درصد جدایه های *E. coli* از جوجه های سالم، ورم ناف، سپتی سمی و سندرم کله باد توانایی تولید آئروباکتین را داشتند (۴۱). نتایج تحقیق ما نیز برروی *E. coli* پاتوژنیک طیور و پستانداران قابل مقایسه با مطالعات قبلی است. در این بررسی پی برده شد که ۸۵ درصد *اشریشیاکلی* های جداشده از کلی باسیلوز آئروباکتین تولید می کنند. تمام مطالعات انجام شده در گذشته و یافته های حاضر دلالت بر وجود یک ارتباط قوی بین تولید آئروباکتین و میزان حدت در

سویه های *E. coli* طیور می باشد.

توانایی تولید کلی سین ها توسط سویه های *E. coli* طیور از موضوعات تحقیقات مورد علاقه در یک دهه اخیر بوده است. اگرچه هنوز هم نقش کلی سین ها در حدت باکتری ها مورد بحث است ولیکن فراوانی پلاسمید Col V در بین سویه هایی که دارای مقاومت سرمی و یا توانایی تولید آئروباکتین هستند بیانگر این حقیقت است که این فنوتیپ (تولید کلیسین) احتمالاً می تواند به عنوان یک نشانگر مهم حدت مطرح باشد. پلاسمیدهای Col V که ژن های مربوط به کلی سین V را حمل می نمایند ممکن است دیگر ژن های عوامل حدت مانند آئروباکتین و مقاومت در برابر اثرات کشندگی سرم را نیز رمز نمایند (۲۲،۲۵). هر چند که مشخص گردیده است این ژن ها بر روی کروموزوم *اشریشیاکلی* مهاجم روده نیز حمل می گردند و باعث افزایش حدت جدایه های *E. coli* در شرایط فقر آهن می گردند (۲۰). Vidotto و همکاران در سال ۱۹۹۰ گزارش نموده اند که ۲۶ نمونه از ۴۵ جدایه *E. coli* مولد کلی سپتی سمی طیور کلی سینوژن بوده و ۲۵ مورد از ۲۶ سویه کلی سینوژن نیز توانایی تولید کلی سین V را داشته اند. همه ۲۶ سویه کلی سینوژن برای جوجه های یکروزه بیماریزا بودند. از ۱۹ جدایه ای هم که توانایی تولید کلیسین V را نداشتند فقط ۳ جدایه برای جوجه های یکروزه بیماریزا بودند (۴۳). Emery و همکاران در سال ۱۹۹۲ تولید کلی سین و کلی سین V در *E. coli* جدا شده از کلی باسیلوز را به ترتیب در ۶۴ و ۵۱ درصد جدایه ها از جوجه های گوشتی و ۶۱ و ۴۲ درصد جدایه ها از بوقلمونها گزارش نمودند (۱۰). مطالعات مقایسه ای بین جدایه های حاصل از موارد بیماری و جوجه های به ظاهر سالم نتایج یکسانی به همراه نداشته است. در مطالعه Wooley و همکاران در سال ۱۹۹۲ اختلاف معنی داری را در تولید کلی سین توسط جدایه های *E. coli* جوجه های بیمار (۶۵ درصد) و سالم (۴۷ درصد) مشاهده نکردند (۴۸). Peighambari و همکاران در سال ۱۹۹۵ در بررسی خود نشان دادند که از بین ۱۰۰ جدایه *E. coli* سلولیت طیور ۸۵ درصد آنها کلی سین و ۲۱ درصد آنها کلی سین V تولید نمودند، در حالی که از ۲۵ جدایه *E. coli* مدفوع طیور سالم به ترتیب ۴۰ درصد و ۲۴ درصد آنها توانایی تولید کلی سین و کلی سین V را داشتند. براین اساس آنها نتیجه گیری نمودند که به طور قابل توجهی جدایه های سلولیت طیور نسبت به جدایه های مدفوع طیور سالم بیشتر کلی سینوژن بودند ولیکن اختلاف معنی داری در تولید کلی سین V به عنوان تنها کلی سین تولیدی بین این دو گروه وجود نداشت (۲۹). Silveira و همکاران در سال ۲۰۰۲ با تحقیق برروی خصوصیات ۵۰ جدایه *E. coli* پاتوژن طیور جداشده از عفونت بند ناف، سپتی سمی، سندرم کله باد و همچنین ۳۰ جدایه از جوجه های سالم، دریافتند که به ترتیب ۳۶/۶ درصد، ۵۴/۱ درصد، ۱۰۰ درصد و ۳۶/۶ درصد جدایه ها کلی سینوژن بودند و در کل از بین ۵۰ سویه *E. coli* پاتوژن طیور، ۵۴ درصد توانایی تولید کلی سین V را داشتند (۴۱). جدایه های E. coli از موارد اسهالی طیور نیز ۴۶ درصد کلی سینوژن و ۳۸ درصد تولیدکننده کلی سین V بودند (۲۲) گرچه بیماریزا بودن جدایه ها از موارد اسهالی طیور نیاز به بررسیهای بیشتر برای شناسایی فاکتورهای حدت آنها دارد.

کلی سینوژنیک بودن درصد بالایی از جدایه های *E. coli* از ضایعات سلولیت و کلی سپتی سمی جوجه ها مورد تأیید سایرین نیز قرار گرفته است (۱۶). اما جالب اینکه بر خلاف عمده پژوهشهای فوق الذکر، در بعضی بررسیها به طور قابل توجهی تولید کلی سین V توسط جدایه ها فزونی داشته است به طوری که از ۳۹ جدایه *E. coli* از ضایعات سلولیت جوجه های گوشتی ۹۲ درصد و از ۵۰ جدایه *E. coli* از سندرم کله باد جوجه ها ۷۸ درصد کلی سین V را تولید نمودند (۲۵،۲۷). نتایج تحقیق حاضر نیز نشان می دهد که ۹۰ درصد جدایه های *E. coli* کلی باسیلوز جوجه های گوشتی کلی سینوژن بودند و ۲۲ درصد آنها نیز توانایی تولید کلی سین V را داشتند. مقایسه نتایج حاضر با گزارشات محققین متقدم مؤید این مهم است که بین تولید کلی سین و جدایه های *E. coli* از موارد کلی باسیلوز طیور ارتباط وجود دارد. ضمن اینکه تولید درصد بالایی از کلی سین هایی غیر از کلی سین V می تواند تولید کلی سین V تولیدی جدایه های کلی باسیلوز طیور را نیز مستور نماید. استفاده از یک روش شناسایی کلی سین V، همچون DNA probe و یا PCR امکان شناسایی دقیق تولید کلی سین V توسط سویه هایی که توسط سایر کلی سین ها پوشانده می شود را فراهم می کند. روی هم رفته داشتن پلاسمیدهای Col V مزیت ویژه ای را جهت رشد باکتری مهیا می سازد (۲۷).

تحقیقات متعدد ثابت نموده که مقاومت سرمی ارتباط قوی و مستقیم با پاتوژنیسیتی *E. coli* دارد (۴۷، ۹،۱۸،۲۴،۲۵). بسیاری از جدایه های *E. coli* از موارد سپتی سمی جوجه ها که قادرند در جریان خون زنده مانده و تکثیر یابند به واسطه مقاومت آنها در برابر فاگوسیتوز و یا اثرات باکتریسیدال مسیرهای کلاسیک و الترناتیو سیستم مکمل می باشد (۲۴). جدایه های *E. coli* از موارد باکتریمی جوجه ها نیز غالباً به اثرات باکتریسیدال سرم خرگوش و سرم جوجه و بوقلمون مقاوم می باشند (۴۳،۴۸). Vidotto و همکاران در سال ۱۹۹۰ در بررسی عوامل حدت ۴۵ جدایه *E. coli* از کلی باسیلوز طیور اعلام نمودند که ۳۱ جدایه ای (۶۸/۸ درصد) که دارای مقاومت سرمی بودند، حدت بالایی نیز داشتند به نحوی که در آزمون میانگین دز کشنده (Mean lethal dose) در جوجه های یکروزه کمترین LD50 را از خود نشان دادند (۴۳). Wooley و همکاران در سال ۱۹۹۲ در تحقیق خود برروی ۴۰ جدایه *E. coli* از موارد کلی سپتی سمی جوجه ها و ۴۰ جدایه *E. coli* از روده جوجه های سالم به این نکته پی بردند که درصد جدایه های کلی سپتی سمی به میزان قابل توجهی از درصد جدایه های روده جوجه های سالم (۶۷/۵ درصد در مقابل ۱۲/۵ درصد) بیشتر به اثر باکتریسیدال سرم مقاوم هستند و بر این اساس اعلام نمودند که مقاومت سرمی یکی از مهمترین عوامل حدت در *E. coli* پاتوژن طیور است (۴۸). همین تیم تحقیقاتی در سال ۱۹۹۳ یک گروه از جدایه های حاد *E. coli* طیور را که مقاومت سرمی بالایی داشتند با گروهی از جدایه های غیرحاد و با مقاومت سرمی پایین *E. coli* طیور مورد مقایسه قرار دادند و دریافتند که گروه اول با تولید

کلی سین V و داشتن لیپوپلی ساکارید (LPS) ارتباط مستقیم دارند اما با داشتن آنتی ژن K چنین ارتباطی ندارند (۴۸). Ngeleka و همکاران در سال ۱۹۹۶ به این نتیجه رسیدند که تمام ۳۹ (۱۰۰ درصد) *E. coli* جداشده از ضایعات سلولیت جوجه های گوشتی به اثر باکتریسیدال سرم مقاوم هستند (۲۵).

Pourbakhsh و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که ۹۰ درصد سویه های *E. coli* جداشده از کلی سپتی سمی طیور دارای مقاومت سرمی هستند و این مقاومت بنا به یافته آنها بیشتر به واسطه داشتن کپسول بوده است (۳۱). Parreira و همکاران که در سال ۱۹۹۸ برروی شناسایی عوامل حدت *E. coli* جدا شده از سندرم کله باد مطالعه می نمودند به این نکته پی بردند که ۷۲ درصد آنها به سرم جوجه سالم مقاوم بودند. همچنین آنها اعلام نمودند که اگرچه ثابت شده که داشتن کپسول K1 با حدت *E. coli* مسبب سپتی سمی جوجه ارتباط دارد ولیکن در تجربه آنها فقط ۱۴ درصد از ۵۰ جدایه مورد بررسی واجد کپسول K1 بود و هیچ ارتباط آماری بین حضور K1 و تولید آئروباکتین با مقاومت سرمی برخلاف یافته های سایر محققین یافت نشد (۲۷). Chaffer و همکاران در سال ۱۹۹۹ در تحقیق خود برروی جدایه های O2 پاتوژن *E. coli* پی بردند که جدایه های با مقاومت سرمی بالا در آزمون کشندگی جوجه ها (Chicken lethality test) از حدت بالایی برخودارند و برعکس. اما با مشاهده یک جدایه با مقاومت سرمی بالا و حدت کم، آنها چنین پیشنهاد نمودند که مقاومت سرمی بالا لازم است اما به تنهایی کافی نیست و احتمالاً زنده ماندن میکروب و تکثیر آن مرتبط با چندین عامل حدت دیگر نیز می باشد (۷). Mellata و همکاران در سال ۲۰۰۱ به هنگام مطالعه بر روی ۵۰ جدایه *E. coli* جداشده از اسهال جوجه ها و طیور به این نتیجه رسیدند که ۴۶ درصد آنها به اثر باکتریسیدال سرم مقاوم هستند (۲۲). Knoble و همکاران در سال ۲۰۰۱ در تحقیقی ملاحظه نمودند که هر ۸ سویه *E. coli* جداشده از بیماری تنفسی شتر مرغ مقاومت سرمی مثبت دارند (۱۸). Jeffrey و همکاران در سال ۲۰۰۲ در قسمتی از تحقیق خود به بررسی ارتباط مقاومت سرمی با عوامل حدت تولید آئروباکتین، تولید کلی سین و کپسول (آنتی ژن K) پرداختند و دریافتند که تولید کلی سین توسط *E. coli* ارتباط بسیار قوی با مقاومت سرمی دارند (۱۶). Ngeleka و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش نمودند که از بین ۵۲ جدایه *E. coli* کلی باسیلوز طیور ۹۶/۲ درصد به اثر باکتریسیدال سرم جوجه سالم مقاوم بودند در حالی که در بین ۵۲ سویه *E. coli* جمع آوری شده توسط سواپ از کلواک جوجه های سالم ۸۷/۵ درصد چنین مقاومت سرمی را نشان دادند. با این وجود آنها ثابت نمودند که با توجه به پدیده چند عاملی مقاومت سرمی بر خلاف جدایه های کلواک فقط جدایه های *E. coli* کلی باسیلوز طیور برای جوجه های یکروزه حاد بودند (۲۴). در پدیده چند عاملی مقاومت سرمی، داشتن کپسول، آنتی ژن سوماتیک O، پروتئین های غشاء خارجی و تولید آئروباکتین دخیل هستند. در مطالعه حاضر نیز از ۱۰۰ جدایه *E. coli* از موارد کلی باسیلوز طیور ۹۴ درصد نسبت به اثر باکتریسیدال سرم جوجه سالم ۴ هفته مقاوم بودند که با نتایج سایر محققین مشابه می باشد و مؤید این حقیقت است که ما در این تحقیق با جدایه های حاد و پاتوژن *E. coli* مواجه هستیم.

در این بررسی تنوع در عوامل حدت، در بین جدایه های مورد آزمایش مشاهده شد. تولید آئروباکتین، کلی سین و مقاومت سرمی سه خصوصیت مهم در سویه های *E. coli* جداشده از کلی باسیلوز طیور در این پژوهش بودند که با یافته های پژوهشگران متقدم همخوانی دارد. البته عمده این پژوهشگران برروی آئروباکتین و مقاومت سرمی به عنوان دو فاکتور مهم حدت تأکید کرده اند. فاکتورهای مهم دیگری در رابطه با حدت *E. coli* وجود دارند که نقش آنها در افزایش حدت باکتری E. coli توسط محققین مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (۷،۱۵،۲۱،۲۴،۲۷،۲۸،۳۱،۳۹،۴۱) اما در این پروژه تحقیقاتی مورد مطالعه قرار نگرفته است که در این میان می توان به آنتی ژن های فیمبریه ای، آنتی ژن های سوماتیک O، کپسول K1 و زهرابه زایی اشاره نمود. تحقیقات بیشتر در مورد فاکتورهای حدت *E. coli* دانش ما رادر خصوص مکانیسم های بیماریزایی این باکتری افزایش خواهد داد.

تشکر و قدردانی

هزینه این پژوهش از محل اعتبارات طرح مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه تهران به شماره ۲۱۸/۲/۵۰۶ وقطب علمی علوم درمانگاهی دامپزشکی وزارت علوم، تحقیقات، و فناوری تامین گردیده است. نویسندگان از آقای دکتر کارلتون جایلز استاد دانشگاه Guelph کانادا به خاطر تأمین نمودن سویه های کنترل مورد استفاده در این طرح صمیمانه تشکر می نمایند.

References

1. Abdul-Aziz, T. and El-Sukhon, S. (1996): Serum sensitivity and apathogenicity for chicken and chick embryos of *Escherichia coli* J5 strain. Vet. Res. 27: 267-271.
2. Amara, A., Ziani, Z. and Bouzoubaa, K. (1995): Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated in Morocco from chickens with colibacillosis. Vet. Microbiol. 43: 325-330.
3. Arp, L.H. and Jensen, A.E. (1980): Piliation, hemagglutination, motility and generation time of *Escherichia coli* that are virulent or avirulent for turkeys. Avian Dis. 24: 153-162.
4. Babai, R., Blum-Oehler, G., Stern, B.E., Hacker, J. and Ron, E.Z. (1997): Virulence patterns from septicemic *Escherichia coli* 078 strains. FEMS Microbiol. Lett. 149: 99-105.
5. Barnes, H.J. and Gross, R.G. (1997): Colibacillosis. In Diseases of Poultry. Edited by B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. MacDougal, and Y.M. Saif. 10th ed. Iowa State University Press, Iowa, USA. PP: 131-141.

6. Brogden, K.A., Roth, J.A., Stanton, T.B., Bolin, C.A., Minion, F.C. and Wannemuehler, M.J. (2000): Virulence mechanisms of bacterial pathogens.3rd ed. ASM Press, USA. PP: 93-104, 119-130 and 163-174.
7. Chaffer, M., Heller, E.D. and Schwartsburd, B. (1999): Relationship between resistance to complement virulence and outer membrane proteins in pathogenic *Escherichia coli* O2 isolates. Vet. Microbiol. 64: 323-332.
8. Davies, D.L., Falkiner, F.R. and Hardy, K.G. (1981): Colicin V production by clinical isolates of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 31: 574-579.
9. Ellis, M.G., Arp, L.H. and Lamont, S.J. (1988): Serum resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated from turkeys. Am. J. Vet. Res. 49: 2034-2037.
10. Emery, D.A., Nagaraja, K.Y., Shaw, D.P., Newman, J.A. and White, D.G. (1992): Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. Avian Dis. 36: 504-511.
11. Fantinatti, F., Silveira, W.D. and Castro, A.F. (1994): Characteristics associated with pathogenicity of avian septicemic *Escherichia coli* strains. Vet. Microbiol. 41: 75-86.
12. Holland, R.E., Schmidt, A., Sriranganathan, N., Grimes, S.D., Wilson, R.A., Brown, C.M. and Walker, R.D. (1996): Characterization of *Escherichia coli* isolated from foals. Vet. Microbiol. 48: 243-255.
13. Holland, R.E., Walker, R.D., Sriranganathan, N., Wilson, R.A. and Ruhl, D.C. (1999): Characterization of *Escherichia coli* isolated from healthy dogs. Vet. Microbiol. 70: 261-268.
14. Horne, S.M., Pfaff-McDonough, S.J., Giddings, C.W. and Nolan, L.K. (2000): Cloning and sequencing of the *iss* gene from virulent avian *Escherichia coli*. Avian Dis. 44:149-184.
15. Jeffrey, J.S., Chin, R.P. and Singer, R.S. (1999): Assessing cellulitis pathogenicity of *Escherichia coli* isolates in broiler chicken assessed by an *in vivo* inoculation model. Avian Dis. 36: 348-352.
16. Jeffrey, J.S., Nolan, L.K., Tonooka, K.H., Wolfe, S., Giddings, C.W., Horne, S.M., Foley, S.L., Lynne, A.M., Ebert, J.O., Elijah, L.M., Bjorklund, G., Pfaff-McDonough, S.J., Singer, R.S. and Doetkort, C. (2002): Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. Avian Dis. 46: 48-52.
17. Kaipainen, T., Pohjanvirta, T., Shpigel, N.Y., Shwimmer, A., Pyorala, S., Pelkonen, S. (2002): Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. Vet. Microbiol. 85: 37-46.
18. Knobl, T., Baccaro, M.R., Moreno, A.M., Gomes, T.A.T., Vieira, M.A.M., Ferreira, C.S.A. and Ferreira, A.J.P. (2001): Virulence properties of *Eschericha coli* isolated from ostriches with respiratory disease. Vet. Microbiol. 83: 71-80.
19. Mackman, N. and Williams, P.A. (1985): Detection of á-Hemolysin production by clinical isolates of *Escherichia coli*. In: The virulence of *Escherichia coli*, Reviews and Methods. Edited by M. Sussman. Academic Press, Inc., London, UK. PP: 425-427.
20. Maloy, S.R., Cronan, J.E. and Freifelder, D. (1997): Microbial Genetics, 2nd ed. Jones and Bartlett Publishers. USA. PP: 213-238.
21. Mellata, M., Bakour, R., Jacquemin, E. and Mainil, J.G. (2001): Genotypic and phenotypic characterization of potential virulence of intestinal avian *Escherichia coli* strains isolated in Algeria. Avian Dis. 45: 670-679.
22. Mellata, M., Jacquemin, E., Bakour, R. and Mainil, J. (1998): Antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains of bovine and avian origin isolated in Algeria, Ann. Med. Vet. 142: 129-138.
23. Nagai, S., Yagihashi, T. and Ishihama, A. (1998): An avian pathogenic *Escherichia coli* strain produces a hemolysin, the expression of which is dependent on cyclic AMP receptor protein gene function. Vet. Microbiol. 60: 227-238.
24. Ngeleka M., Brereton L., Brown G., Fairbrother J.M. (2002): Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to *tsh*-, *pap*-, *pil*-, and *iuc*-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. Avian Dis. 46: 143-52.
25. Ngeleka, M., Kwaga, J.K., White, D.G., Whittam, T.S., Riddell, C., Goodhope, R., Potter, A.A. and Allan, B. (1996): *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: Clonal relationships among strains and analysis of virulence associated factors of isolates from diseased birds. Infect. Immun. 64: 3118-3126.
26. Nicklin, J., Graeme-Cook, K., Paget, T. and Killington, R. (1999): Instant notes in microbiology. Viva Books Private Limited, New Delhi, India. PP: 73-80, 122-124 and 165-175.
27. Parreira, V.R., Arns, C.W. and Tano, T. (1998): Virulence factors of avian *Escherichia coli* associated with swollen head syndrome. Avian Pathol. 27: 148-159.
28. Parreira, V.R. and Gyles, C.L. (2002): Shiga toxin genes in avian *Escherichia coli*. Vet. Microbiol. 87: 341-352.

29. Peighambari, S.M., Vaillancourt, J.P., Wilson, R.A., Gyles, C.L. (1995): Characteristics of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis. Avian Dis. 39:116-24.

30. Pfaff-McDonough, S.J., Horne, S.M., Giddings, C.W., Ebert, J.O., Doetkott, C., Smith, M.H. and Nolan, L.K. (2000): Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. Avian Dis. 44: 23-33.

31. Pourbakhsh, S.A., Boulianne, M., Martineau-Doize, B. and Fairbrother, J.M. (1997): Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. Vet. Microbiol. 58: 195-213.

32. Pourbakhsh, S. A., Goodarzi, H., Khodashenas, M., Madani, R. (2000): Identification and purification of F11 fimbriae on avian pathogenic *Escherichia* coli. Arch. Razi Inst. 51: 63-73.

33. Prescott, M., Harley, J.P. and Klein, D.A. (2002): Microbiology. 5th ed. McGraw-Hill Company, UK. PP: 53-66, 790 and 787-820.

34. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. and Carter, J.R. (1994): Clinical Veterinary Microbiology. Wolf Publishing, London, UK. PP: 95-102.

35. Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J., and Leonard, F.C. (2002): Veterinary Microbiology and Microbial Diseases, Blackwell Science, UK.PP: 36-40 and 106-112.

36. Reingold, J., Starr, N., Maurer, J. and Lee, M.D. (1999): Identification of a new *Escherichia coli* She hemolysin homolog in avian *Escherichia coli*. Vet. Microbiol. 66: 125-134.

37. Riley, M.A. and Gordon, D.M. (1999): The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. Trends Microbiol. 7: 129-133.

38. Rosenberger, J.K., Fries, P.A., Cloud, S.S and Wilson, R.A. (1985): In vitro and vivo characterization of avian *Escherichia coli* II. Factors associated with pathogenicity. Avian Dis. 29: 1094-1107.

39. Salvadori, M.R., Yano, T., Carvalho, H.F., Parreira, V.R. and Gyles, C.L. (2001): Vacoulating cytotoxin produced by avian pathogenic *Escherichia coli*. Avian Dis. 45: 43-51.

40. Schwarz, S., Kehrenberg, C. and Walsh, T.R. (2001): Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. Int. J. Antimicrob. Agents. 17: 431-437.

41. Silveira, W.D., Ferreira, A., Brocchi, M., Hollanda, L.M., Castro, A.F.P., Yamda, A.T. and Lancellotti, M. (2002): Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. Vet. Microbiol. 85: 47-53.

42. Taylor, P.W. (1985): Measurement of the bactericidal activity of serum. In: The virulence of *Escherichia coli*, Reviews and Methods. Edited by M. Sussman. Academic Press, Inc., London, UK. PP: 445-456.

43. Vidotto, M.C., Muller, E.E., Freitas, J.C., Alfieri, A.A., Guimaraes, I.G. and Santos, D.S. (1990): Virulence factors of avian *Escherichia coli*. Avian Dis. 34: 531-538.

44. Volk, W.A., Gerhardt, B.A., Hammarskjol, M.L. and Kadner, R.J. (1996): Essentials of Medical Microbiology. 5th ed. Lippincott Raven, USA. PP: 322-328.

45. Whittam, T.S. and Wilson, R.A. (1988): Genetic relationships among pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. Infect. Immun. 56: 2458-2466.

46. Wooley, R.E., Gibbs, P.S., Brown, T.P. and Mallrer, J.J. (2000): Chicken embryo lethality assay for determining the virulence of avian *Escherichia coli* isolates. Avian Dis. 44: 318-324.

47. Wooley, R.E., Nolan, L.K., Brown, J., Gibbs, P.S., Giddings, C.W. and Torner, K.S. (1993): Association of K-1 capsule, smooth lipopolysaccharides, *tra* T gene, and colicin V production with complement resistance and virulence of avian *Escherichia coli*. Avian Dis. 37: 1092-1096.

48. Wooley, R.E., Spears, K.R., Brown, J., Nolan, L.K. and Fletcher, O.S. (1992): Relation of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. Avian Dis. 36: 679-684.

49. Wray C. and Davies R.H. (2002): Colibacillosis. In Poultry Diseases. Edited by F.T.W. Jordan, M. Pattison, D. Alexander, and T. Faragher. 5th ed. W.B. Saunders Company, USA. PP: 125-130.