نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۵ تابستان ۱۳۹۶
DOI: 10.22034/vj.2017.109227

شناسایی ژنوتیپی ژن‌های کد کننده کپسول و فیمبریه F1 در جدایه‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از مدفوع طیور گوشتی در استان کرمان

• **بهرام شفیعی بجگان**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان- ایران
• **رضا قنبرپور (نویسنده مسئول)**
گروه پژوهش میکروبیولوژی مولکولی، دانشکده دامپزشکی،دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران
• **بابک خیرخواه**
گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران
تاریخ دریافت: فروردین ۹۵ تاریخ پذیرش: تیر ۹۵
Email: ghanbar@uk.ac.ir

چکیده

اشریشیا کلی یکی از باکتری‌های روده پستاندران و پرندگان است و بیشتر سویه‌های این باکتری بیماری‌زا نیستند ولی برخی از سروتیپ‌های آن ممکن است در پرندگان بیماری‌هایی نظیر کلی سپتی‌سمی، عفونت کیسه زرده، تورم صفاق، تورم مجرای تخم، التهاب غشای مفاصل،آبسه کف پا و تورم کیسه‌های هوایی ایجاد نمایند. هدف از این تحقیق شناسایی ژن‌های کد کننده کپسول و فیمبریه F1 در جدایه‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از مدفوع طیورگوشتی در استان کرمان است.تعداد ۶۰ نمونه از مدفوع طیور گوشتی جمع‌آوری و جدایه‌ها توسط آزمایش‌های بیوشیمیایی و فنوتایپی مورد بررسی قرار گرفتند و سپس‌با استفاده از روش Multiplex PCR ژن‌های *ibeA*، *PAP EF*، *kpsMT III*، *fimH* و *PAI* ردیابی شدند. از ۶۰ جدایه مورد بررسی، در۵۰ جدایه (۸۳/۳۳ درصد) ژن *fimH*، ۱۲ جدایه (۲۰درصد) *kpsMT III*، سه جدایه (پنج درصد) *PAP A*، دوجدایه (۳/۳ درصد) *ibeA* و ۱۱ جدایه (۱۸/۳۳ درصد) *PAPEF* شناسایی گردید. روش PCRMultiplex یک روش ژنوتیپی خیلی اختصاصی قدرتمند و موثر برای شناسایی اپرون‌های کدکننده چسبندگی و دیگر عوامل حدت مسبب عفونت می‌باشد.

کلمات کلیدی: *اشریشیا کلی*، PCR Multiplex، ژن کپسول، فیمبریه

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 115 pp: 100-106

Genotypic identification of genes Encoding Capsule and F1 fimbria in *Escherichia coli* isolated from Feces of broilers in Kerman province

By: Shafiee Bajgan, B., Department of Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran. Ghanbarpour, R., (Corresponding Author) Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid-Bahonar University, Kerman, Iran. Kheirkhah, B., Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

Received: 2016-04-07 Accepted: 2016-07-10

Email: ghanbar@uk.ac.ir

Escherichia coli bacteria are as a normal flora in intestine of mammals and birds, and most strains are not pathogenic while some strains can cause different disease such assepticemia, peritonitis, salpingitis, synovitis, omphalitis, coli-granuloma and yolk sac infection. The purpose of this research was to identify genes coding for capsule and fimbriae F1 in *E. coli* strains isolated from feces of broiler chickens in Kermanprovince. A total of 60 samples were collected from the feces of broilers from the veterinary faculty of Kerman. These isolates were confirmed by phenotypic methods like culture and biochemical tests. Then multiplex PCR was performed to identify *fimH, kpsMT III, PAP A,ibeA* and *PAPEF* genes. Out of 60 isolates, 50 isolates (83.33%) amplified *fimH*, 12 (20%) amplified *kpsMT III*, 3 (5%) amplified *PAP A,* 2 (3.3%) amplified ibeA and 11 isolates (18.33%) amplified *PAP EF*.Multiplex PCR method is a powerful and effective method to detect very specific adhesion-encoding operon and other virulence factors of E. coli strains causing infection.

Keyword: ***Escherichia coli,*** Multiplex PCR, Capsule gen, fimbriae

مقدمه

سرو تایپ‌های متعددی از *اشریشیاکلی* در محیط حیوانات اهلی و پرنده‌ها وجود دارد (۱). به طور کلی، *اشریشیاکلی* یک ارگانیزم فرصت طلب است و تنها چند سروتیپ آن در انسان‌ها، پرندگان و حیوانات اهلی بیماری‌زا است (۲). *اشریشیا کلی* جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش پرندگان محسوب می‌شود. عوامل حدت که غالباً به سویه‌های بیماری‌زای *اشریشیاکلی* 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 (۳). اتصال اولین مرحله ضروری برای بیماری‌زایی *اشریشیاکلی* توسط فیمبریه *FilmH* می‌باشد (۴). فیمبریه‌ها از واحدهای پروتئینی تحت نام فیمبرین تشکیل شده است که وزن مولکولی آن‌ها ۳۰-۱۴ کیلودالتون است در پیلی مرتبط با پیلونفریت (*pap*)، فیمبرین papA بخش عمده‌ای از قسمت میله‌ای فیمبریه را تشکیل داده و رشته‌های نوک آن از فیمبرین‌های *papE* و *papF* تشکیل شده است (۵ و ۶). فیمبرین‌های *papE*، *papF* را تحت واحدهای فیمبریه‌ای فرعی می‌نامند لازم به ذکر است که در این فیمبریه، فیمبرین *papG* در نوک رشته انتهای فیمبریه قرار گرفته و امکان اتصال باکتری به پذیرنده‌های اختصاصی میزبان را فراهم می‌سازد و به همین دلیل آن‌را تحت واحد چسبندگی (Adhesin) می‌نامند (۷). *اشریشیاکلی* می‌تواند بیش از ۸۰ نوع کپسول پلی ساکاریدی (آنتی ژن k) متفاوت تولید نماید. بیان یک کپسول پلی ساکاریدی از خصوصیات مرسوم برخی از سویه‌های *اشریشیاکلی* می‌باشد. این ساختار با احاطه سطوح سلولی در تعاملات مختلف بین باکتری و محیط خارجی مشارکت می‌کند (۱۰-۸). کپسول‌ها در *اشریشیاکلی* بر اساس خصوصیات ژنتیکی و بیوشیمیایی در چهار گروه تقسیم‌بندی می‌گردد. آنتی‌ژن‌های گروه ۲ در *اشریشیا کلی*‌های جدا شده از تعدادی از عفونت‌های مختلف انسان و حیوانات بیان می‌شوند (۱۰-۸). این آنتی‌ژن‌ها توسط، لوکوس *kps* در نزدیکی serA کدگذاری‌شده، از لحاظ ساختمانی شباهت به کپسول‌های پلی‌ساکاریدی بیان شده در جنس‌های نایسریا و هموفیلوس دارند. یکی از ژن‌های کدکننده کپسول در *اشریشیا کلی* *kpsMT III* می‌باشد. یکی دیگر از ژن‌های حدت در *اشریشیا کلی* ibeA است، که کدکننده یک پروتئین ۵۰ کیلو دالتونی (۴۵۶ آمینو اسید) می‌باشد و عملکرد دقیق آن هنوز ناشناخته مانده است (۱۳-۱۱). ژن کدکننده آن در یک مجموعه جزایز بیماری‌زا به طول ۲۰۳ کیلو باز بین نواحی yjiD و yjiE واقع شده و در واقع شامل چهار اپرون تنظیم کننده می‌باشد. گیرنده برای IbeA بر روی سطح سلول‌های عروق اندوتلیال مغزی انسان و گاو شناسایی شده است اما در پرندگان هنوز به خوبی شناخته شده نیست (۱۳-۱۱). ژن PAI بصورت مجموعه جزایر بیماری‌زا به طول ۲۰۰-۱۰ کیلو باز در مجاورت ژن‌هایtRNA حاوی توالی‌های تکراری، اینتگراز و ترانسپواز، و دارای محتوای G + C متفاوت نسبت به سایر قسمت‌های ژنوم باکتری است. این ژن در حدت باکتری *اشریشیاکلی* نقش اساسی دارد

(۱۵-۱۴). روش‌های بسیاری برای تایپینگ اشریشیاکلی جهت مطالعه اپیدمیولوژی آن مورد استفاده قرار گرفته اند. ارزش اپیدمیولوژیکی این روش‌ها به قدرت تفکیک، قابلیت اطمینان و سهولت انجام آن‌ها بستگی دارد. یکی از این روش‌ها استفاده از Multiplex PCR می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی فراوانی ژن‌های *PAP EF*، *kpsMT III*، *fimH* و *ibeA* و PAI در *اشریشیاکلی* جدا شده از مدفوع طیورگوشتی استان کرمان بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها و شناسایی فنوتیپی

در این تحقیق از ۶۰ نمونه مدفوع طیورگوشتی استفاده شده است. نمونه‌ها از بانک باکتریایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان جمع آوری شد. از محیط آگار خوندار یا مک‌کانکی و EMB آگار جهت تایید و شناسایی باکتری *اشریشیا کلی* استفاده گردید. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت نگهداری شدند. این باکتری بر روی محیط کشت مک‌کانکی پرگنه‌هائی به قطر یک الی دو میلی متر به رنگ صورتی تولید می کند. از تست های بیوشیمیایی احیای نیترات، اکسیداز، TSI، سیمون سیترات،SIM، اوره آز، فنیل آلانین دآمیناز، لیزین دکربوکسیلاز وMRVP برای تشخیص دقیق ایزوله‌های *اشریشیا کلی* استفاده شد (۷).

Multiplex PCR

استخراج DNA با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت سیناژن ایران انجام شد. پس از استخراج DNA- باکتریایی آزمایش PCR (Multiplex PCR) ژن‌های *ibeA*، *PAP EF*، *kpsMT III*، *fimH* و *PAI* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (۱۹-۱۶) انجام گرفت. واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد که هر واکنش شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر X10 ، ۰/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۱۰۰ Mm -۰/۵ میکرولیتر dNTP با غلظت ۲۰ Mm، ۱۰ pmol از هر یک از آغازگرها، یک واحد آنزیم Taqpolymerase و یک میکرولیتر از DNA ژنومی بود که با آب مقطر دو بار تقطیر به حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر رسید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت مرحله طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (۱۹-۱۶). برای مشاهده نتیجه تکثیر هر یک از ژن‌های مورد مطالعه، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد در شرایط ۱۵۰ ولت در بافر ۱۰X TBE تجاری (Fermentase, USA) انجام شد.

نتایج

۶۰ ایزوله *اشریشیا کلی* توسط تست‌های بیوشیمیایی مورد تایید و

جدول ۱- توالی آغازگرهای fimH، kpsMT III، PAP FE، ibeA و PAI

gens	Primer sequence (۵-۳)	Size of product (bp)	references
fimH	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	۵۰۸	۱۶
kpsMT III	TCCTCTTGCTACTATTCCCCCT AGGCGTATCCATCCCTCCTAAC	۳۹۲	۱۷
ibeA	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	۱۷۰	۱۸
PAI	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	۹۳۰	۱۸
PAP EF	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	۳۲۸	۱۹

شناسایی قرار گرفتند. پس از الکتروفورز و مشاهده باندها برای هریک از ژن های مورد بررسی، اندازه باندها به شرح ذیل بود: به ترتیب برای ژن *PAP A* باند ۷۲۰ جفت باز، ژن *fim H* باند ۵۰۸جفت باز، ژن *kpsIII* باند ۳۹۲جفت باز، ژن *papEF* باند ۳۳۶ جفت بازو ژن *ibeA* باند ۱۷۰ جفت بازمشاهده شد (شکل.۱). از تعداد ۶۰ جدایه، تعداد ۵۰ جدایه (۸۳/۳۳ درصد) واجد ژن *fimH*، ۱۲ جدایه (۲۰ درصد) دارای ژن *kpsMT III*، سه جدایه (پنج درصد) دارای ژن *PAP A*، دوجدایه (۳/۳ درصد) دارای ibeA و ۱۱ جدایه (۱۸/۳۳ درصد) دارای ژن *PAPEF* بودند (جدول-۲). بیشترین و کمترین فراوانی ژن به ترتیب در تحقیق حاضر *fimH* و *ibeA* بود.

بحث

کلی باسیلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی گله های طیور صنعتی می‌باشد. عامل این بیماری *اشریشیا کلی* است که جزء فلور طبیعی روده انسان، پستاندران و پرندگان است (۱). عموماً *اشریشیاکلی* یک پاتوژن فرصت‌طلب به شمار می‌رود که در انسان و پستاندران مسئول عفونت‌های گوارشی است، درحالی‌که در گونه‌های اهلی پرندگان موجب عفونت‌های غیر گوارشی عمومی یا موضعی می‌شود که متعاقب آسیب‌دیدگی یا درهم شکستن سد دفاعی پرنده وقوع می‌یابد (۵-۱). کلی باسیلوز در تمام گونه‌های پرندگان اهلی و در سنین مختلف بروز می‌کند اما عفونت در پرندگان جوان شایعتر است و بیشتر در سنین چهار تا نه هفتگی رخ می‌دهد. عفونت‌های ناشی از *اشریشیا کلی* صدمات اقتصادی قابل توجهی را سالیانه به صنعت طیور تحمیل می‌کند. این کاهش سودآوری می‌تواند تمام مراحل تولید صنعت گوشت طیور را تحت تاثیر قرار دهد. عوامل حدت که غالباً به سویه‌های بیماری‌زای *اشریشیاکلی* 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 (۵-۱). لذا این مطالعه با هدف شناسایی ژن‌های حدت *ibeA* ، *PAPEF*، *kpsMTIII*، fimH و *PAI* در *اشریشیا کلی* جدا شده از مدفوع طیورگوشتی استان کرمان با استفاده از روش Multiplex-PCR انجام شد. انوری‌نژاد و همکاران (۱۳۸۷) در بررسی اپیدمیولوژیک ژن‌های حدت سویه‌های *اشریشیاکلی* جداشده از طیور مبتلا به عفونت ادراری نشان دادند درصد شیوع ژن‌های *1-Cnf*، *pap*، *sfa*، *hly* به ترتیب در میان سویه‌ها ۲۷/۱ درصد، ۱۴/۶ درصد، ۱۳/۵ درصد و ۲۲/۹ درصد بود. تعداد ۳۲ نمونه (۳۳/۳ درصد) برای حداقل یکی از ژن‌ها و شش نمونه (۶/۳ درصد) برای تمامی چهار ژن مثبت بودند. شایع‌ترین ژن‌ها *pap/sfa* بودند (۲۰). مولین اسکولر و همکارانشان در سال ۲۰۰۶ اعلام کردند بیش از ۹۷ درصد از سویه‌های هر دو گروه انسانی و پرندگان دارای ژن از اپرون FIM و اپرون SFA بودند، اما ژن چسبندگی (fimbriae P، fimbriae F۱C یا *Afa*) در هیچ یک از سویه‌ها شناسایی نشده است. فقط یک سویه جدا شده از پرنده (سویه BEN۸۰۶) دارای بیان ژن *papGII* بود. فراوانی ژن *fimH* در مطالعه حاضر ۸۳/۳۳ درصد میزان قابل ملاحظه‌ای می باشد (۲۱). وانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۱ میزان شیوع ژن *ibeA* را در ۲۰ ایزوله *اشریشیا کلی* جدا شده از پرندگان ۴/۳ درصد اعلام کردند که با نتیجه این مطالعه ۳/۳ درصد مطابقت دارد (۲۲). جانسون و همکارانش در سال ۲۰۰۸ فراوانی ژن *kpsMTIII* از *اشریشیا کلی* جدا شده از پرندگان را ۱/۱ درصد گزارش نموده است. فراوانی ژن *kpsMTIII* در مطالعه حاضر ۲۰ درصد بود (۲۳). ژائو و همکاران در سال ۲۰۰۹ به بررسی ژن‌های مختلف حدت در ۱۰۰ ایزوله *اشریشیا کلی* جدا شده از پرندگان پرداختند. تعداد و فراوانی ژن‌های گزارش شده ۹۵ (۹۵ درصد) برای ژن *fimH* ۱۷ درصد برای ژن *papA*، ۴۱ (۴۱ درصد) برای ژن *papEF*، ۲ (۲ درصد) برای ژن *kpsMTIII* و ۱۷ (۱۷ درصد) برای ژن *ibeA* بود. دلیل اختلاف تعداد و درصد میزان گزارش شده از ژن‌های حدت در مطالعات مختلف احتمالاً به نوع نمونه مورد مطالعه، نوع سویه، نوع پرنده، نحوه پرورش طیور درهر منطقه، نوع عادت غذایی، سطح عمومی بهداشت منطقه، میزان جمعیت و حتی روش نمونه‌گیری مربوط باشد که می‌توانند در میزان فراوانی ژن‌های کدکننده عوامل حدت در ایزوله‌های مولد عفونت نقش داشته باشند. برای شناسایی ژن‌های حدت از روش Multiplex PCR استفاده شد. ژن‌های مورد نظر در زمان مناسب و با دقت زیاد شناسایی گردید و توانایی روش Multiplex PCR برای شناسایی این ژن‌ها تایید شد.

نتیجه‌گیری

در نهایت پیشنهاد می‌گردد با توجه به تغییرات گوناگونی که امروزه

جدول۲- فراوانی ژن های حدت مورد مطالعه جداسازی شده از نمونه های مدفوع طیور

ژن *اشریشیا کلی*	درصد	تعداد
fimH	۸۳/۳۳	۵۰
kpsMT III	۲۰	۱۲
PAP A	۵	۳
ibeA	۳/۳	۲
PAP EF	۱۸/۳۳	۱۱

در فنوتیپ باکتری‌های پاتوژن چه به صورت طبیعی و چه به صورت دستکاری‌های ژنتیکی و عمدی صورت می‌گیرد و باعث اختلال در تشخیص این باکتری‌ها به روش های سنتی می‌شود، از روش‌های مولکولی که سریع تر و دقیق نیز می‌باشند استفاده گردد. همچنین تشخیص همزمان چندین عامل باکتریایی توسط روش Multiplex PCR از آن جهت که در زمان و هزینه مواد مصرفی صرفه جویی می شود می تواند به عنوان جایگزین روشهای متداول که بسیار وقت‌گیر و پرهزینه هستند مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله تمامی نویسندگان مقاله از گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان و مدیریت و پرسنل آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد که ما را در انجام این طرح تحقیقاتی یاری رساندند تقدیر و تشکر می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

1. Dho-Moulin M, Fairbrother JM. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC).*Vet Res*. 30(2): 299-316.

2. van den Bogaard AE, Stobberingh EE. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. Int *J Antimicrob Agents*. 14: 327-35.

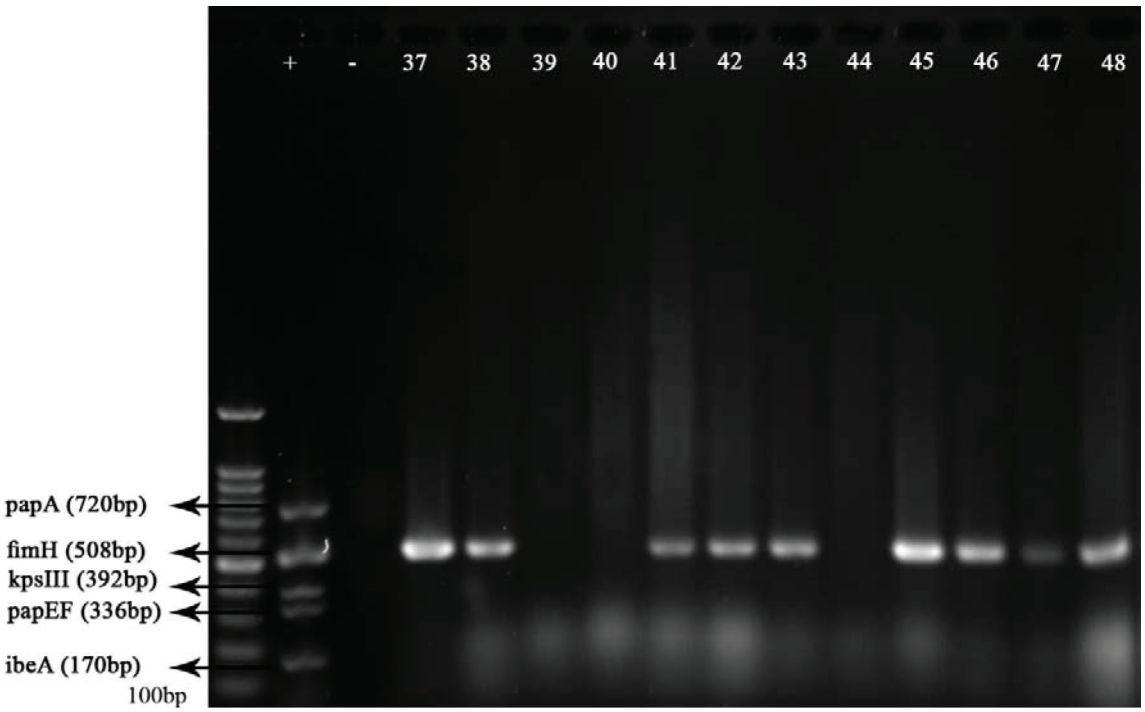
3. Vidotto MC, Müller EE, De Freitas JC, Alfieri AA, Guimarães IG, Santos DS.(1190). Virulence factors of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 531-38.

4. Croxen MA, Finlay BB. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat ReviMicrobiol*. 8: 26-38.

5. Jones CH, Dexter P, Evans AK, Liu C, Hultgren SJ, Hruby DE.(2002). *Escherichia coli* degp protease cleaves between paired hydrophobic residues in a natural substrate: The papa pilin. *J Bacteriol*. 184: 5762-71.

6. Båga M, Göransson M, Normark S, Uhlin B. (1985).Transcriptional activation of a pap pilus virulence operon from uropathogenic *Escherichia coli*. *EMBO J*.4: 3887.

7. Cortés P, Blanc V, Mora A, Dahbi G, Blanco JE, Blanco M, et al.(2010). Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and



شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورز محصول Multiplex PCR با استفاده از آغازگر ژن‌های حدت *اشریشیا کلی*
***PAI*، ibeA، *kpsMT III*، *fimH* و PAP EF:MMarker 100bp.–(+):کنترل مثبت و(-): کنترل منفی**

pig farms in Spain. *Appl Environ Microbiol*.76: 2799-805.
8. Horwitz M, Silverstein S. (1980). Influence of the *Escherichia coli* capsule on complement fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes. *J Clin Invest*. 65: 82.
9. Whitfield C, Roberts IS. (1999). Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Molecul Microbiol*. 31: 1307-19.
10. Roberts IS. (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annual Revi Microbiol*. 50: 285-315.
11. Smith A, Boulnois G, Roberts I. (1990). Molecular analysis of the *Escherichia coli* k5 kps locus: Identification and characterization of an inner-membrane capsular polysaccharide transport system. *Molecul Microbiol*. 4: 1863-69.
12. Kanamaru S, Kurazono H, Ishitoya S, Terai A, Habuchi T, Nakano M, et al. (2003). Distribution and genetic association of putative uropathogenic virulence factors iron, iha, kpsmt, ompt and usp in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Japan. *J Urology*. 170: 2490-93.
13. Germon P, Chen Y-H, He L, Blanco JE, Brée A, Schouler C, et al. (2005). Ibea, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*.*Microbiol*. 151: 1179-86.
14. Gebendorfer KM, Drazic A, Le Y, Gundlach J, Bepperling A, Kastenmüller A, et al. (2010). Identification of a hypochlorite-specific transcription factor from *Escherichia coli*. *J Biolo Chem*. 287: 6892-903.
15. Martínez Medina M. (2009). Intestinal microbiology in crohn's disease: A study of *Escherichia coli* as a potential etiologic agent: Universitat de Girona.
16. Chapman TA, Wu X-Y, Barchia I, Bettelheim KA, Driesen S, Trott D, et al. (2006). Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl Environ Microbiol*.72: 4782-95.
17. Timothy S, Shafi K, Leatherbarrow AH, Jordan F, Wigley P. (2008). Molecular epidemiology of a reproductive tract-associated colibacillosis outbreak in a layer breeder flock associated with atypical avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Pathol*. 37: 375-78.
18. White A, Sibley K, Sibley C, Wasmuth J, Schaefer R, Surette M, et al. (2011). Intergenic sequence comparison of *Escherichia coli* isolates reveals lifestyle adaptations but not host specificity. Appl Environ Microbiol. 77: 7620-32.
19. Tarchouna M, Ferjani A, Ben-Selma W, Boukadida J. (2013). Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Inter J Infect Dis*. 17: e450-e53.
20. Anvarinejad M, FarshadSh, Hoseini M.(2011). Comparison of Genetic Patterns of *E. coli* Strains Isolated from Patients with Cystitis and Pyelonephritis, Using Pulsed Field Gel Electrophoresis. *J Kerman Uni Med Sci*. 18(3): 207-217.
21. Moulin-Schouleur M, Schouler C, Tailliez P, Kao M-R, Brée A, Germon P, et al. (2006). Common virulence factors and genetic relationships between o18: K1: H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *J Clin Microbiol*. 44: 3484-92.
22. Wang S, Niu C, Shi Z, Xia Y, Yaqoob M, Dai J, et al. (2011). Effects of ibea deletion on virulence and biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 79: 279-87.
23. Johnson TJ, Logue CM, Wannemuehler Y, Kariyawasam S, Doetkott C, DebRoy C, et al. (2009). Examination of the source and extended virulence genotypes of *Escherichia coli* contaminating retail poultry meat. *Foodborn patho Dis*. 6: 657-67.
24. Zhao L, Gao S, Huan H, Xu X, Zhu X, Yang W, et al. (2009). Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. *Microbiol*.155: 1634-44.