



## شناسایی ژنوتیپی ژن‌های کد کننده کپسول و فیمبریه F1 در جدایه‌های اشریشیاکلی 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

اشریشیاکلی یکی از باکتری‌های روده پستانداران 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 اشریشیاکلی جدا شده از مدفوع طیور گوشتی در استان کرمان است. تعداد ۶۰ نمونه از مدفوع طیور گوشتی جمع‌آوری و جدایه‌ها توسط آزمایش‌های بیوشیمیایی و فنوتایپی مورد بررسی قرار گرفتند و سپس با استفاده از روش Multiplex PCR ژن‌های *PAI*، *fimH*، *kpsMT III*، *PAP EF*، *ibeA* و *PAPA* شناسایی شدند. از ۶۰ جدایه مورد بررسی، در ۵۰ جدایه (۸۳/۳۳ درصد) ژن *fimH*، ۱۲ جدایه (۲۰ درصد) *kpsMT III*، سه جدایه (۵ درصد) *PAPA*، دو جدایه (۳/۳ درصد) *ibeA* و ۱۱ جدایه (۱۸/۳۳ درصد) *PAP EF* شناسایی گردید. روش PCR Multiplex یک روش ژنوتیپی خیلی اختصاصی قدرتمند و موثر برای شناسایی اپرون‌های کد کننده چسبندگی و دیگر عوامل حدت مسبب عفونت می‌باشد.

کلمات کلیدی: اشریشیاکلی، 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 as septicemia, peritonitis, salpingitis, synovitis, omphalitis, coligranuloma 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 Kerman province. 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 *PAPEF*. 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

بیان یک کپسول پلی ساکاریدی از خصوصیات مرسوم برخی از سویه های *شریشیا کلی* می باشد. این ساختار با احاطه سطوح سلولی در تعاملات مختلف بین باکتری و محیط خارجی مشارکت می کند (۸-۱۰). کپسول ها در *شریشیا کلی* بر اساس خصوصیات ژنتیکی و بیوشیمیایی در چهار گروه تقسیم بندی می گردد. آنتی ژن های گروه ۲ در *شریشیا کلی* های جدا شده از تعدادی از عفونت های مختلف انسان و حیوانات بیان می شوند (۸-۱۰). این آنتی ژن ها توسط، لوکوس *kps* در نزدیکی *serA* کدگذاری شده، از لحاظ ساختمانی شباهت به کپسول های پلی ساکاریدی بیان شده در جنس های نایسریا و هموفیلوس دارند. یکی از ژن های کدکننده کپسول در *شریشیا کلی kpsMT III* می باشد. یکی دیگر از ژن های حدت در *شریشیا کلی ibeA* است، که کدکننده یک پروتئین ۵۰ کیلو دالتونی (۴۵۶ آمینو اسید) می باشد و عملکرد دقیق آن هنوز ناشناخته مانده است (۱۱-۱۳). ژن کدکننده آن در یک مجموعه جزایز بیماری زا به طول ۲۰۳ کیلو باز بین نواحی *yjiE* و *yjiD* واقع شده و در واقع شامل چهار اپرون تنظیم کننده می باشد. گیرنده برای *IbeA* بر روی سطح سلول های عروق اندوتلیال مغزی انسان و گاو شناسایی شده است اما در پرندگان هنوز به خوبی شناخته شده نیست (۱۱-۱۳). ژن PAI بصورت مجموعه جزایز بیماری زا به طول ۲۰۰-۱۰ کیلو باز در مجاورت ژن های tRNA حاوی توالی های تکراری، اینترگاز و ترانسپوز، و دارای محتوای G+C متفاوت نسبت به سایر قسمت های ژنوم باکتری است. این ژن در حدت باکتری *شریشیا کلی* نقش اساسی دارد

سرو تایپ های متعددی از *شریشیا کلی* در محیط حیوانات اهلی و پرندها وجود دارد (۱). به طور کلی، *شریشیا کلی* یک ارگانیزم فرصت طلب است و تنها چند سروتیپ آن در انسان ها، پرندگان و حیوانات اهلی بیماری زا است (۲). *شریشیا کلی* جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش پرندگان محسوب می شود. عوامل حدت که غالباً به سویه های بیماری زا *شریشیا کلی* طیور نسبت داده می شوند شامل فیمبریه، دارا بودن تاژک، تولید آئروباکتین، تولید باکتریوسین ها، تولید همولیزین، وجود پلاسمیدهای بزرگ، مقاومت دارویی و بعضی عوامل دیگر می باشند (۳). اتصال اولین مرحله ضروری برای بیماری زایی *شریشیا کلی* توسط فیمبریه *FimH* می باشد (۴). فیمبریه ها از واحدهای پروتئینی تحت نام فیمبرین تشکیل شده است که وزن مولکولی آن ها ۳۰-۱۴ کیلودالتون است در پیلی مرتبط با پیلونفریت (*pap*)، فیمبرین *papA* بخش عمده ای از قسمت میله ای فیمبریه را تشکیل داده و رشته های نوک آن از فیمبرین های *papE* و *papF* تشکیل شده است (۵ و ۶). فیمبرین های *papE*، *papF* را تحت واحدهای فیمبریه ای فرعی می نامند لازم به ذکر است که در این فیمبریه، فیمبرین *papG* در نوک رشته انتهای فیمبریه قرار گرفته و امکان اتصال باکتری به پذیرنده های اختصاصی میزبان را فراهم می سازد و به همین دلیل آن را تحت واحد چسبندگی (Adhesin) می نامند (۷). *شریشیا کلی* می تواند بیش از ۸۰ نوع کپسول پلی ساکاریدی (آنتی ژن k) متفاوت تولید نماید.

## Multiplex PCR

استخراج DNA با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت سیناژن ایران انجام شد. پس از استخراج DNA-باکتریایی آزمایش Multiplex PCR (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 ۱۰۰-۰/۵ 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 پلیمرز 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 طولی 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/شیرشیا کلی توسط تست‌های بیوشیمیایی مورد تایید و

(۱۴-۱۵). روش‌های بسیاری برای تایپینگ اشیرشیاکلی 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 *fimH*، *kpsMT III*، *PAP EF*، *ibeA* و *PAI* در/شیرشیاکلی 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 جمع‌آوری شد. از محیط آگار خوندار یا مک‌کانکی و EMB آگار جهت تایید و شناسایی باکتری/شیرشیاکلی استفاده گردید. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت نگهداری شدند. این باکتری بر روی محیط کشت مک‌کانکی پرگنه‌هائی به قطر یک الی دو میلی‌متر به رنگ صورتی تولید می‌کند. از تست‌های بیوشیمیایی احیای نیترات، اکسیداز، TSI، سیمون سیترات، SIM، اوره آز، فنیل آلانین دامیناز، لیزین دکربوکسیلاز و MRVP برای تشخیص دقیق ایزوله‌های/شیرشیاکلی استفاده شد (۷).

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

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

نشان دادند درصد شیوع ژن های *hly*, *sfa*, *pap*, *I-Cnf* به ترتیب در میان سویه ها ۲۷/۱ درصد، ۱۴/۶ درصد، ۱۳/۵ درصد و ۲۲/۹ درصد بود. تعداد ۳۲ نمونه (۳۳/۳ درصد) برای حداقل یکی از ژن ها و شش نمونه (۶/۳ درصد) برای تمامی چهار ژن مثبت بودند. شایع ترین ژن ها *pap/sfa* بودند (۲۰). مولین اسکولر و همکارانشان در سال ۲۰۰۶ اعلام کردند بیش از ۹۷ درصد از سویه های هر دو گروه انسانی و پرندگان دارای ژن از اپرون FIM و اپرون SFA بودند، اما ژن چسبندگی (*FimB* P. *fimbriae* F1C) یا *Afa* در هیچ یک از سویه ها شناسایی نشده است. فقط یک سویه جدا شده از پرند (سویه BEN۸۰۶) دارای بیان ژن *papGII* بود. فراوانی ژن *fimH* در مطالعه حاضر ۸۳/۳۳ درصد میزان قابل ملاحظه ای می باشد (۲۱). وانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۱ میزان شیوع ژن *ibeA* را در ۲۰ ایزوله /شریشیا 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 /شریشیا 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 ژن های مختلف حدت در ۱۰۰ ایزوله /شریشیا کلی جدا شده از پرندگان پرداختند. تعداد و فراوانی ژن های 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 ژن های حدت در مطالعات مختلف احتمالاً به نوع نمونه مورد مطالعه، نوع سویه، نوع پرند، نحوه پرورش طیور در هر منطقه، نوع عادت غذایی، سطح عمومی بهداشت منطقه، میزان جمعیت و حتی روش نمونه گیری مربوط باشد که می توانند در میزان فراوانی ژن های کدکننده عوامل حدت در ایزوله های مولد عفونت نقش داشته باشند. برای شناسایی ژن های حدت از روش Multiplex PCR استفاده شد. ژن های مورد نظر در زمان مناسب و با دقت زیاد شناسایی گردید و توانایی روش Multiplex PCR برای شناسایی این ژن ها تایید شد.

### نتیجه گیری

در نهایت پیشنهاد می گردد با توجه به تغییرات گوناگونی که امروزه

شناسایی قرار گرفتند. پس از الکتروفورز و مشاهده باندها برای هر یک 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 ۵۰۸ جفت باز، ژن *kpsIII* باند ۳۹۲ جفت باز، ژن *papEF* باند ۳۳۶ جفت باز و ژن *ibeA* باند ۱۷۰ جفت باز مشاهده 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* دو جدایه (۳/۳ درصد) دارای *ibeA* و ۱۱ جدایه (۱۸/۳۳ درصد) دارای ژن *PAP EF* بودند (جدول ۲). بیشترین و کمترین فراوانی ژن به ترتیب در تحقیق حاضر *fimH* و *ibeA* بود.

### بحث

کلی باسیلوز یکی از مهم ترین بیماری های عفونی گله های طیور صنعتی می باشد. عامل این بیماری /شریشیا کلی است که جزء فلور طبیعی روده انسان، پستانداران و پرندگان است (۱). عموماً /شریشیا کلی یک پاتوژن فرصت طلب به شمار می رود که در انسان و پستانداران مسئول عفونت های گوارشی است، در حالی که در گونه های اهلی پرندگان موجب عفونت های غیر گوارشی عمومی یا موضعی می شود که متعاقب آسیب دیدگی یا در هم شکستن سد دفاعی پرند وقوع می یابد (۵-۱). کلی باسیلوز در تمام گونه های پرندگان اهلی و در سنین مختلف بروز می کند اما عفونت در پرندگان جوان شایعتر است و بیشتر در سنین چهار تا نه هفتگی رخ می دهد. عفونت های ناشی از /شریشیا کلی صدمات اقتصادی قابل توجهی را سالیانه به صنعت طیور تحمیل می کند. این کاهش سودآوری می تواند تمام مراحل تولید صنعت گوشت طیور را تحت تاثیر قرار دهد. عوامل حدت که غالباً به سویه های بیماری زای /شریشیا کلی طیور نسبت داده می شوند شامل فیمبریه، دارا بودن تاژک، تولید آئروباکتین، تولید باکتریوسین ها، تولید همولیزین، وجود پلاسمیدهای بزرگ، مقاومت دارویی و بعضی عوامل دیگر می باشند (۵-۱). لذا این مطالعه با هدف شناسایی ژن های حدت *ibeA*، *PAP EF*، *kpsMTIII*، *fimH* و *PAI* در /شریشیا کلی جدا شده از مدفوع طیور گوشتی استان کرمان با استفاده از روش Multiplex-PCR انجام شد. انوری نژاد و همکاران (۱۳۸۷) در بررسی اپیدمیولوژیک ژن های حدت سویه های /شریشیا کلی جدا شده از طیور مبتلا به عفونت اداری

جدول ۲- فراوانی ژن های حدت مورد مطالعه جداسازی شده از نمونه های مدفوع طیور

ژن /شریشیا کلی	درصد	تعداد
<i>fimH</i>	۸۳/۳۳	۵۰
<i>kpsMT III</i>	۲۰	۱۲
<i>PAP A</i>	۵	۳
<i>ibeA</i>	۳/۳	۲
<i>PAP EF</i>	۱۸/۳۳	۱۱

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 Rev Microbiol*. 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

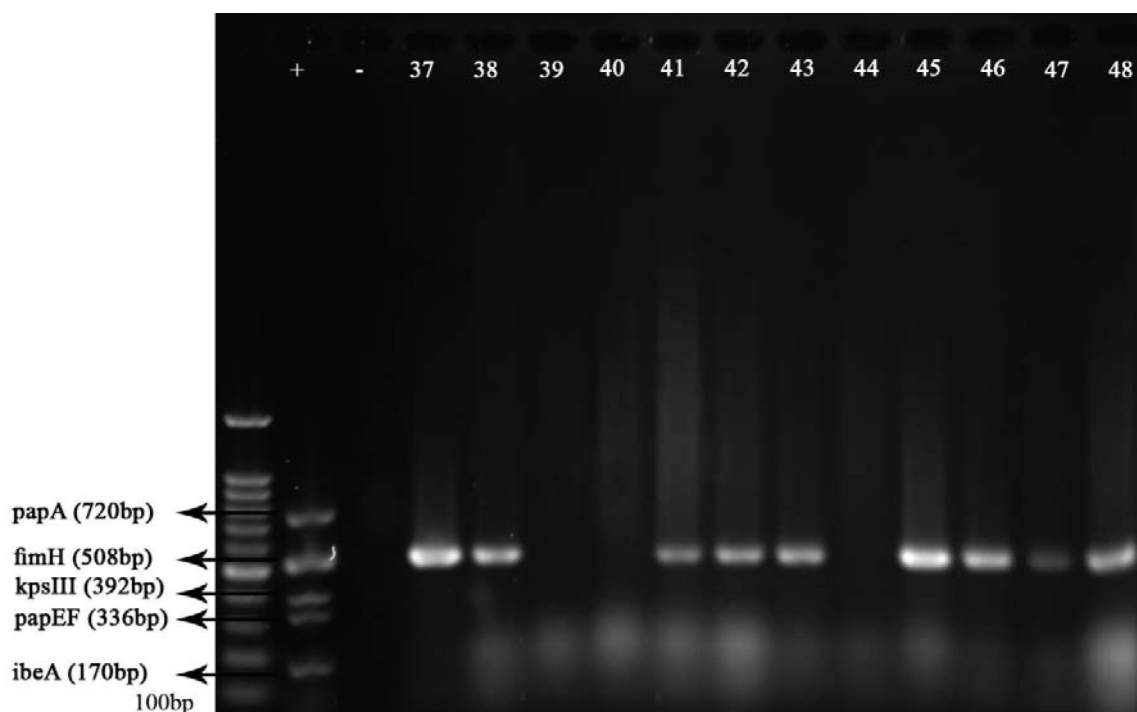
در فنوتیپ باکتری‌های پاتوژن چه به صورت طبیعی و چه به صورت دستکاری‌های ژنتیکی و عمدی صورت می‌گیرد و باعث اختلال در تشخیص این باکتری‌ها به روش‌های سنتی می‌شود، از روش‌های مولکولی که سریع تر و دقیق نیز می‌باشند استفاده گردد. همچنین تشخیص همزمان چندین عامل باکتریایی توسط روش Multiplex PCR از آن جهت که در زمان و هزینه مواد مصرفی صرفه جویی می‌شود می‌تواند 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.



شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورز محصول Multiplex PCR با استفاده از آغازگر ژن‌های حدت/شیریشیا کلی PAP EF:MMarker 100bp. و *fimH*, *kpsMT III*, *ibeA*, *PAI* (+):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.

