JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

دوره سوم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۱
صفحات ۱۵۰-۱۴۳

شناسایی مولکولی ژنهای حدت ompT ،iss و iroN در جدایه‌های اشریشیاکلی از موارد کلی باسیلوز در مزارع جوجه گوشتی استان گلستان

پیام حقیقی خوشخو[1*]، سعید مخیری[2]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، کرج، ایران

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده دامپزشکی، کرج، ایران

**نویسنده مسئول:* pkhoshkho@kiau.ac.ir

چکیده

از آنجایی که اشریشیا کلی‌های پاتوژن طیور مسئول ضررهای اقتصادی قابل توجهی به صنعت پرورش طیور هستند لذا شناخت مولکولی و تعیین فراوانی عوامل حدت آنها می‌تواند زمینه ساز برای روشهای پیشگیرانه همچون ساخت واکسن باشد. توانایی سویه‌های اشریشیاکلی در بیماری‌زایی به واسطه داشتن عوامل حدت متنوعی می‌باشد که توسط ژنهای مختلف بیان می‌شوند. در این مطالعه تعداد ۶۰ جدایه اشریشیاکلی از موارد کلی باسیلوز مزارع جوجه گوشتی استان گلستان انتخاب و پس از استخراج DNA به روش جوشاندن، حضور و فراوانی سه ژن مرتبط به حدت iss, ompT و iroN به کمک روش multiplex PCR مورد بررسی قرار گرفت. ژن iss یکی از مهمترین ژنهای شناسایی شده در مقاومت به سرم می‌باشد. iroN در بیان سیستم اکتساب آهن نقش دارد و ompT سبب بیان پروتئازی می‌شود که در غیرفعال سازی کلی سین نقش دارد. فراوانی ژنهایiss, ompT و iroN به ترتیب ۳۸/۳%، ۴۳/۳% و ۴۰% بدست آمد و در ۳۵% جدایه‌ها این سه ژن به طور همزمان وجود داشتند. با توجه به این نتایج و وجود تنوع در فراوانی این ژنها در مناطق مختلف دنیا به نظر می‌رسد که عوامل حدت اشریشیاکلی در مناطق مختلف دنیا با هم متفاوت باشند زیرا عوامل حدت، پدیده‌ای چند عاملی هستند. همچنین این احتمال وجود دارد که این جدایه‌ها، اشریشیاکلی‌های فرصت طلبی بوده‌اند که به دلیل وجود عوامل مستعد کننده توانسته‌اند سبب بیماری شوند.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلی، کلی باسیوز، ژنهای حدت، شناسایی مولکولی، ایران

JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 3(3)143-150, 2012

Molecular detection of the iss, ompT and iroN genes in E. coli isolated from cases of avian colibacillosis in commercial broilers of Golestan province, Iran

Haghighi Khoshkhoo P.*[1], Mokhayeri S.[2]

1- Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

2- Faculty of Veterinary Medicine, karajBranch, Islamic Azad University, Karaj,Iran

**** Corresponding author:*** pkhoshkho@kiau.ac.ir

Abstract

Avian pathogenic E. coli (APEC) are responsible for significant economic losses in chicken industry, thus identification of virulence genes and their prevalence can be helpful to preventative methods such as productions of vaccine. The pathogenicity of APEC strains is due to a variety of several virulence factors that expressed by several genes .In this study, 60 E.coli strains were selected from cases of avian colibacillosis in commercial broilers from Golestan province. DNA was extracted by boiling method and three important virulence genes, iss, ompT and iroN, were detected by multiplex PCR. iss is one of the important gene in increased serum survival. iroN involves in iron acquisition mechanism and ompT encodes protease, which has been shown to cleave colicins. Prevalence of iss, ompT and iroN genes were detected in 38/3%, 43/3% and 40% of isolates respectively and 35% of isolates were positive for the presence of three genes altogether. With regard to final results and the existence of varieties in frequency of these genes in different parts of the world it concluded that virulence factors were different in different parts of the world because virulence factors are multifactorial phenomenon. It seems that these isolates are opportunistic E.coli and because of existence of predisposing factors they could cause disease in poultry.

Key words: Escherichia coli, Avian colibacilosis, Virulence genes, Molecular detection, Iran

مقدمه

اشریشیا کلی‌های پاتوژن طیور (Avian Pathogenic Escherichia coli=APEC) سبب بیماری‌های متنوعی در طیور می‌شوند که مسئول ضررهای اقتصادی قابل توجهی به صنعت طیور هستند (۸،۳). بیماری زایی سویه‌های مختلف APEC به واسطه بیان عوامل حدت متنوعی است (۸) که مهمترین آنها شامل چسبندگی، تولید توکسین، محافظت، مکانیسم‌های اکتساب آهن و تهاجم است)۳ (و ژنهای متـعددی مسئول بیان این فاکتورهای حدت مـی‌باشند. تـعداد ایـن ژنها را تا ۴۶ عدد عـنوان می‌کنند (۱۲) با این حال اکثر مطالعـات حدود ۵ ژن iss, ompT, iroN, hlyF, iutA را که توسط پلاسمید حمل می‌شـوند(۱۸،۱۲،۱۱) در تفریق جدایه‌های APEC از اشریشیا کلی‌های مدفوعی طیـور (Avian Fecal Escherichia coli=AFEC) کمک کننده می‌دانند و مطالـعه بر روی این ۵ ژن را هم ارزش ژنوتایپینگ ۴۶ ژن حدت می‌دانند(۱۲).

ژن iss که پروتئین ISS را بیان می‌کند(۳)در مقاومت به سرم نقش دارد و به میزان بالاتری در جدایه‌های APEC نسبت به AFEC جدا شده از پرندگان سالم وجود دارد (۱۸،۱۵،۱۲،۱۱،۷،۳). پروتئین ISS از رسوب کمپلکس حمله کمپلمان، با مکانیسم ناشناخته‌ای جلوگیری می‌کند(۷). ژن iroN که پروتئین IroN را بیان می‌کند به عنوان گیرنده سیدرفور عمل می‌کند و در مکانیسم اکتساب آهن دخالت دارد و ژن ompT سبب بیان OmpT می شود که نوعی پروتئاز بوده و در شکافتن کلی سین E2 ,A E1 و E3 دخالت دارد(۱۸).

گزارشی از میزان فراوانی ژنهای ompT, iss و iroN درایران تا به حال وجود ندارد. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی سه ژن مربوط به حدت ompT, iss و iroN در اشریشیا کلی‌های جدا شده از موارد کلی باسیلوز در سطح مزارع پرورشی جوجه گوشتی استان گلستان به کمک روش multiplex PCR بوده است.

مواد و روش کار

نمونه‌های باکتری: ۶۰ جدایه اشریشیاکلی از بانک باکتریایی بخش بیماری‌های طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج انتخاب شد. این ۶۰ جدایه برگرفته از یک مطالعه بر روی الگوی مقاومت آنتی باکتریال در اشریشیاکلی‌های جدا شده از جوجه‌های گوشتی مبتلا به کلی باسیلوز در استان گلستان بود(۱). در مطالعه فوق ۱۵۰ نمونه اشریشیاکلی پس از تایید کلی باسیلوز بر مبنای علایم بالینی و کالبدگشایی، از خون قلب‌های مبتلا به پریکاردیت جوجه‌های گوشتی ۳۰ مزرعه (۵ نمونه از هر مزرعه) بر روی محیط مک کانکی (Merck Co, Germany) جدا شد و سپس با تست‌های بیوشیمیایی اختصاصی به تایید رسید. برای مطالعه حاضر نیز به طور اتفاقی دو نمونه اشرشیاکلی از هر مزرعه (مجموعا ۶۰ نمونه) انتخاب شد و در محـیط کشت مغز و قلب (Brain Heart Broth=BHB, Merck Co, Germany) کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

استخراج DNA: برای استخراج DNA از روش boiling استفاده شد. ۱۰۰ µl از اشریشیاکلی رشد کرده در محیط BHB با ۴۰۰ µl آب مقطر دو بار تقطیر مخلوط و در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی گراد بمدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس DNAهای استخراج شده به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد انتقال داده شدند تا از آنها به عنوان DNA الگو استفاده شود.

واکنش زنجیره ای پلی مراز به روش Multiplex: مشخصات سه ژن هدف و پرایمرهای آنها در جدول ۱ آورده شده است)۱۲). واکنش Multiplex PCR در حجم نهایی ۲۵ µl با واکنشگر های PCR (جدول۲) انجام شد. لازم به ذکر است که در این واکنش سه جفت پرایمر به طور همزمان استفاده شده است.

جدول۱: سکانس پرایمرها و خصوصیات سه ژن مورد نظر

ژن	اندازه قطعه (bp)	سکانس پرایمر	خصوصیات (رفرانس)
iss	۳۲۳	5’-CAGCAACCCGAACCACTTGATG AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA-3’	Episomal increased serum survival gene (۱۷)
ompT	۴۹۶	5’-TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC-3’	Episomal outer membrane protease gene (۱۷)
iroN	۵۵۳	5’-AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT GTTCGGGCAACCCCTGCTTTGACTTT-3’	Salmochelin siderophore receptor gene (۱۷)

جدول۲: واکنشگرهای PCR

10x PCR Buffer	2.5 µl
Taq DNA polymerase (5 U/ul) (Cinna Gen Co, Iran)	0.3 µl
Forward Primer (20 pmole/ul)	1 µl ×3
Reverse Primer (20 pmole/ul)	1 µl ×3
MgCl2 (50 mM)	1.5 µl
dNTP (10 mM) (Cinna Gen Co, Iran)	1.5 µl
dd H2O	9.2 µl
Template DNA	4 µl
Total volume	25

میکرو تیوب‌ها در ترموسایکلر (Swift maxi Model, ESCO Co, Singapour) قرار گرفت و برنامه حرارتی زیر برای آن اعمال شد: مرحله واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد بمدت ۲ دقیقه و سپس اجرای ۲۵ سیکل ۳ مرحله‌ای شامل: ۹۴ درجه سانتی گراد بمدت ۳۰ ثانیه (واسرشت)، ۶۳ درجه سانتی گراد بمدت ۳۰ ثانیه (اتصال)، ۶۸ درجه سانتی گراد بمدت ۳ دقیقه (طویل شدن) و نهایتا طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد بمدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

الکتروفورز: جهت شناسایی و رویت محصول PCR از الکتروفورز (EPS-600Z, Paya pajoohesh pars Co, Iran) نمونه‌ها در روی ژل و بافر TBE استفاده شد. برای تهیه آگار ۱%، ژل آگاروز با خلوص بالا (Ultra pure agarous) در بافر TBE با حرارت حل شده و سپس در قالب ریخته و شانه گذاری شد. بعد از سفت شدن ژل، شانه خارج و ژل در دستگاه الکتروفورز قرار داده شد و بافر TBE تا پوشاندن کامل ژل در تانک ریخته شد. ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با یک میکرولیتر از بافر بار گذاری (Loading buffer) مخلوط ودر گوده های ژل قرار داده شد. سپس الکترودها به منبع تغذیه متصل و ژل در جریان ثابت ۱۰۰ ولت به مدت ۹۰ دقیقه قرار گرفت و نهایتا ژل در ظرف مخصوص رنگ آمیزی حاوی ۰/۵ میکرولیتر در میلی لیتر اتیدیوم برماید به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و بعد از شستشو با آب مقطر، تحت نور UV حضور باند رویت و با دستگاه عکس برداری یو وی فلورسانس (Felix® 5050 Model, Biostep Co., Germany) عکس گرفته شد. لازم به ذکر است که از کنترل منفی و مارکر DNA (DNA ladder, 100 bp, Fermentas Co., Spain) هم جهت

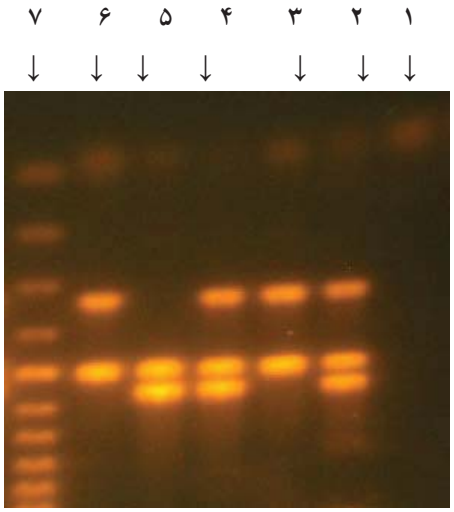
مقایسه استفاده شد.

نتایج

مشاهده باند های DNA و مقایسه آن با مارکر DNA با سایز باندهای ذکر شده در مقالات با این پرایمرها همخوانی داشت. بر این اساس، سایز باند DNA برای ژن iss ۳۲۳ جفت باز، برای ژن ompT ۴۹۶ جفت باز و برای ژن iroN ۵۵۳ جفت باز بود. بررسی فراوانی این ۳ ژن حدت در ۶۰ جدایه ازAPEC ایران با تکنیک Multiplex PCR نشان داد که ژن iss در۲۳ جدایه (۳۸/۳%)، ژن ompT در ۲۶ جدایه (۴۳/۳%) و ژن iroN در ۲۴ جدایه (۴۰%) موجود می‌باشد. همچنین ۲۱ جدایه از ۶۰ جدایه (۳۵%) حاوی هر سه ژن بودند در ۳۴ جدایه از ۶۰ جدایه (۵۶/۶%) هیچ کدام از این ژن‌های حدت وجود نداشتند. ۲ جدایه از ۶۰ جدایه (۳/۳%) واجد ژن‌های iss و ompT و فاقد ژن iroN بود و ۳ جدایه از ۶۰ جدایه (۵%) از نظر وجود ompT و iroN مثبت بود در حالی که ژن iss را نداشتند (جدول۳ و تصویر شماره ۱).

جدول ۳: چهار الگوی فراوانی ژنهای حدت iss, ompT و iroN در جدایه‌های E.coli مورد مطالعه

شماره الگو	الگوی فراوانی	جدایه (درصد)
۱	iss^{+} $iroN^{+}$ $ompT^{+}$	۲۱(٪ ۳۵)
۲	iss^{+} $iroN^{-}$ $ompT^{+}$	۲(٪ ۳/۳)
۳	iss^{-} $iroN^{+}$ $ompT^{+}$	۳(٪ ۵)
۴	iss^{-} $iroN^{-}$ $ompT^{-}$	۳۴(٪ ۵۶/۶)



تصویر ۱- محصول PCR ژنهای حدت iss, ompT و iroN در جدایه‌های E.coli در حضور مارکر DNA {۱: کنترل منفی، ۲ و ۴: ژنهای حدت iss, ompT و iroN، ۳ و ۶: ژنهای حدت iss, ompT، ۵: ژنهای حدت ompT، iron، ۷: مارکر DNA (۱۰۰ جفت باز، باند درخشان ۵۰۰ جفت باز می باشد)}.

بحث و نتیجه گیری

پیشگیری وکنترل کلی باسیلوز در طیور با استفاده از درمان های ضد میکروبی و بهینه سازی محل پرورش وشرایط مدیریتی امکان پذیر است با این حال به دلیل افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها و خطر باقیمانده دارویی در تولیدات طیور امروزه توجه به روشهای جایگزین مانند ساخت واکسن معطوف شده که این امر نیازمند شناخت ژنهای حدت و تعیین فراوانی آنها در هر منطقه می‌باشد (۱۱,۷).

در مطالعات متعددی ارتباط بین حدت جدایه های APEC و وجود ColV پلاسمیدی نشان داده شده است (۱۱,۷). یک ناحیه kb ۹۳ از ColV پلاسمید شناخته شده که شامل چندین ژن و اپران از جمله ompT، iss و salmochelin operon (iroBCDN) می‌باشد که در حدت نقش دارند(۱۱). مطالعات نشان داده که فراوانی سه ژن ompT، iroN (۱۸,۱۲,۱۱)، iss (۱۸,۱۷,۱۴,۱۱,۶) در اشـریشـیاکلی‌های پاتوژن طیور نسبت به اشریشیاکلی های جدا شده از پرندگان سالم بیشتر است. بنظر می رسد که بررسی چندین ژن در ناحیه محافظت شده ColV پلاسمید می‌تواند در تفریق APECها از سویه‌های هم سفره (Commensal) کمک کننده باشد (۱۸,۱۲,۱۱).

همچنین ارتباط بین مقاومت سرم و حدت نشان داده شده است(۱۳). فاکتورهای مقاومت به سرم در پیشرفت و حدت کلی سپتی سمی طیور موثرند زیرا که اجازه‌ی فرار باکتری از اثر باکتری کشی کمپلمان را می‌دهند(۱۶). یکی از ژنهای مهم اشریشیاکلی‌های پاتوژن طیور که در مقاومت به سرم نقش دارد iss می‌باشد(۱۹).

در اکثر مطالعات انجام شده در نقاط مختلف دنیا فراوانی iss در حدود ۸۲-۷۲ درصد در موارد APEC گزارش شده است (۱۹,۱۸,۱۷,۱۴,۱۲,۱۱,۹). با این حال فراوانی iss در APEC درچین ۵۸/۵ درصد (۱۰)، در ۲ مطالعه در مجارستان ۵۷ و ۶۳ درصد (۵,۴) , در کره ۴۱/۵ درصد (۲۲) و در برزیل ۳۸/۵ درصد (۶) گزارش شده است.این در حالی است که فراوانی این ژن در این مطالعه ۳۸/۳ درصد می باشد.

فراوانی ژن های ompT، iroN به ترتیب در APEC در سه مطالعه در آمریکا ۸۸/۲-۷۰/۵ درصد (۱۸) , ۸۵/۴ -۶۷/۲ درصد (۱۱) و ۸۵/۲ - ۷۸/۵ درصد (۱۲) گزارش شده است. این در حالی است که در این مطالعه فراوانی این ژنها به ترتیب ۳۹/۳ -۴۲/۶ درصد بدست آمده است. فراوانی iroN در E.coliهای جدا شده از موارد عفونی انسان ۳۶/۷ درصد اعلام شده است(۲).

اگر چه در این مطالعه در۵۶/۶ درصد موارد APEC هیچ کدام از این سه ژن یافت نشدند، Delicato و همکاران هم گزارش کردند که در ۲۷/۵ درصد جدایه‌ها هیچ کدام از هفت ژن معروف حدت وجود نداشتند(۶).

اگر چه این ژنها (iss, ompT, iroN) نقش مهمی در پاتوژنیسیته بازی میکنند، در فراوانی ژنهای حدت APEC در مناطق مختلف دنیا گزارشات و یافته های متنوعی موجود است (۲۰). به نظر می رسد در تفسیر این تفاوت‌ها دلایل زیر دخیل باشند:

۱- از آنجایی که وقوع بیماری نتیجه‌ی تداخلات میزبان – عامل بیماری زا و محیط است، تغییر در یکی از این موارد میتواند بر وقوع و شدت بیماری تاثیر گذار باشد. از آنجایی که هیچ کدام از این سه ژن حدت در۵۶/۶ درصد موارد یافت نشد، احتمالا این اشریشیاکلی ها، از نوع فرصت طلب (Opportunistic) هستند که به علت وجود عوامل مستعد کننده بیماری یا شرایط نامطلوب محیطی و پرورشی توانسته‌اند منجر به بیماری شوند(۱۲). بر این اساس پیشنهاد می‌شود که نقش عوامل مستعد کننده و شرایط محیطی بر شدت کلی باسیلوز و فراوانی ژنهای حدت در موارد APEC بررسی شود.

۲-عوامل حدت، پدیده‌ای چند عاملی (Multifactorial phenomenon) با کنش- واکنش بر همدیگر هستند (۲۱) برای مثال مقاومت اشریشیاکلی به کمپلمان مربوط به چندین فاکتور ساختاری از جمله کپسول، بخصوص k۱ کپسول , لایه LPS و پروتئین‌های غشاء خارجی از جمله TraT، ISS و ompA است (۳). بنابراین

عامل حدتی مانند فاکتور مقاومت به سرم، با بیش از چند ژن کنترل می‌شوند که عدم حضور یک ژن الزاما به معنای نبود فنوتیپی آن فاکتور حدت نیست و این بدان معنی است که سویه‌های مختلف APEC می‌توانند برای بیماری زایی از راههای جایگزین دیگری استفاده کنند (۲۱). بنابراین پیشنهاد می‌شود اثرات همپوشانی و راههای جایگزینی این فاکتورها و بالطبع ژنهای آنها بررسی شوند(۶).

۳- از آنجا که در بیشتر موارد یا این سه ژن به طور همزمان حضور داشتند (۳۵%) یا اینکه هیچ کدام از این ژنها حضور نداشتند (۵۶/۶%) این فرضیه را قوت می بخشد که وقوع این ژنها معمولا به طور همزمان، در منطقه محافظت شده‌ی ColV پلاسمید (Conserved portion ColV plasmid) است که بیانگر وجود یا عدم وجود این پلاسمید در E.coliهای مورد مطالعه است (۱۲,۱۱,۳)

References

1- Alinezhad I. (2008), Drug resistance patterns of Escherichia coli isolated from cases of avian colibacillosis in Golestan province, Iran, D.V.M thesis, Karaj Islamic Azad University, No. 862.

Ananias M., Yano T. (2008) Serogroups and virulence genotypes of Escherichia coli isolated from patients with Sepsis. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 41: 877-883.

2- Barnes H. J., Nolan L. K. , Vaillancourt J. F. (2008) Colibacillosis: *In* Y. M. Saif et al., Diseases of poultry, 12th ed. Blackwell Publishing, Arres, IA. pp: 691–732.

3- Cătană N., Popa V., Fodor I., Măroiu G. (2008) Molecular screening regarding the presence of the iss genes, fim H and ompA at the *E. coli* isolated from the broiler chickens. Buletin USAMV Veterinary Medicine, 65: 310-315.

4- Cătană N., Popa V., Herman V., Fodor I. (2008) Phenotypical and genotypical characteristics of *E. coli* strains isolated from avian colibacillosis outbreaks. Lucr. St. Med. Vet., XXXXI: 340-343.

5- Delicato E.R., de Brito B.G., Gaziri L.C.J. and Vidotto M.C. (2003) Virulence associated genes in Escherichia coli isolates from poultry with colibacillosis. Veterinary Microbiology, 94: 97-103.

6- Dziva F. and Stevens M.P. (2008) Colibacillosis in poultry: unraveling the molecular basis of virulence of avian pathogenic Escherichia coli in their natural hosts, Avian Pathology, 37: 355–366.

7- Ganbarpour R., Sami M., Salehi M., Ouromiei M. (2011) Phylogenetic background and virulence genes of E.scherichia coli isolates from colisepticemic and healthy broiler chickens in Iran. Trop Anim Health Prod, 43: 153-157.

8- Jeffrey J.S., Nolan L.K., Tonooka K.H., Wolfe S., Gid-

dings 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., Doetkott C.(2002) Virulence Factors of Escherichia coli from Cellulitis or Colisepticemia Lesions in Chickens. Avian diseases, 46: 48–52.

9- Jin W.J., Zheng Z.M., Zhang Y.Z., Qin A.J., Shao H.X., Liu Y.L., Wang J., Wang Q.Q. (2008) Distribution of Virulence-Associated Genes of Avian Pathogenic *Escherichiacoli* Isolates in China. Agricultural Sciences in China, 7: 1511-1515.

10- Johnson T.J., Siek K.E., Johnson S.J. & Nolan L.K. (2006) DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmidencoded virulence genes among avian Escherichia coli strains. Journal of Bacteriology, 188: 745-758.

11- Johnson T.J.,Wannemuehler Y.,Doetkott C., Johnson S.J.,Rosenberger S.C. and Nolan L.K. (2008) Identification of minimal predictor of avian pathogenic E.scherichia coli virulence for use as a rapid diagnostic tool. Journal of clinical microbiology, 46: 3987-3996.

12- Mellata M., Dho-Moulin M., Dozois C.M., Curtiss III R., Brown P.K., Arné P., Breé A., Desautels C. & Fairbrother, J.M. (2003). Role of virulence factor in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. Infect. Immun., 71: 536-540.

13- McPeake S.J.W., Smyth J.A., Ball H.J.(2005) Characterisation of avian pathogenic Escherichia coli (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. Veterinary Microbiology, 110: 245–253.

14- Nakazato G., de Campos T.A., Stehling E.G., Brocchi M., da Silveira W.D. (2009) virulence factors of avian pathogenic Escherichia coli(APEC).Pesq. Vet. Bras, 29: 479-486.

15- Parreira V.R., Arns C.W., Yano T. (1998) Virulence factors of avian *Escherichia coli* associated with swollen head syndrome**.** Avian Pathology, 27: 148-154.

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

17- Rodriguez-Siek K.E., Giddings C.W., Doetkott C., Johnson T.J., Nolan L.K. (2005) Characterizing the APEC pathotype, Veterinary Research, 36: 241–256.

18- Sampaio Baptista A.A., Kobayashi R.K.T., José Venâncio E., Vidotto M.C.(2010) Cloning, expression and sequence diversity of iss gene from avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated in Brazil. Ciências Agrárias, 31: 723-732.

19- Someya A., Otsuki K., Murase T. (2007) Characterization of *Escherichia coli* Strains Obtained from Layer Chickens Affected with Colibacillosis in a Commercial Egg-Producing Farm. *J. Vet. Med. Sci.* 69: 1009–1014.

20- Vandekerchove D. (2004) Colibacillosis in battery-caged layer hens: Clinical and bacteriological characteristics and risk factor analysis, Thesis submitted in fulfilment of the requirements for the degree of Doctor (Ph.D.) in Veterinary Sciences. Ghent University, Belgium.

21- Won G.Y., Moon B.M., Oh I.G., Matsuda K., Chaudhari A.A., Hur, J., Eo, S.K., Yu, I.J., Lee, Y.J., Lee, Y.S., Kim, B.S., Lee, J.H. (2009) Profiles of virulence-associated genes of avian pathogenic E.scherichia coli isolates from chickens with colibacillosis. J. Poult. Sci., 46: 260-266.