شناسایی مولکولی ژنهای حدت چسبندگی، نکروز کننده و همولیزین در سویه های UPEC و APEC جدا شده از نمونه‌های بالینی و طیور

سپیده شمس‌گلی[1]، غلامعلی مرادلی[2*]، کیومرث امینی[3]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران
۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران
۳. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۱/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۰۵)

چکیده

زمینه و هدف: *اشریشیاکلی* اوروپاتوژنیک (Uropathogenic *Escherichia coli*) و *اشریشیاکلی*‌های بیماریزای پرندگان (Avian Pathogenic *Escherichia coli*) واجد محدوده وسیعی از فاکتورهای حدت در انسان و طیور می‌باشند. این فاکتورها در ایجاد کلونیزاسیون، تهاجم و متعاقب آن کاهش پاسخ دستگاه ایمنی میزبان نقش دارند که شامل ژن‌های *hly*،*afa*،*sfa*،*pap* و *cnf* می‌باشند. هدف این مطالعه ردیابی مولکولی ژنهای چسبندگی، نکروز کننده و همولیزین پاتو وارهای UPEC, APEC/*اشریشیاکلی* جدا شده از انسان و طیور است.

روش بررسی: در مجموع ۳۶ جدایه *اشریشیاکلی* از نمونه های بالینی بیماران دارای عفونت ادراری پذیرش شده در بیمارستانهای کرمان و ۳۶ جدایه *اشریشیاکلی* طیور از دانشکده دامپزشکی استان کرمان اخذ گردید. جدایه ها بر اساس تست های بیوشیمیایی و باکتریولوژی استاندارد تشخیص داده شدند. به منظور شناسایی ژن های حدت *hly*،*afa*،*sfa*،*pap* و *cnf* واکنش Multiplex- PCR در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

یافته‌ها: بررسی ژن‌ها نشان داد که در نمونه‌های طیور تعداد ۱۰ جدایه (۲۷/۷) درصد حاوی ژنهای حدت و ۲۲ جدایه (۱/)۶۱ درصد در نمونه‌های انسانی از نظر حضور ژن مثبت بودند. ژنهای *cfa* و *cnf* در هیچ یک از نمونه‌های انسانی و طیور ردیابی نگردید. بیشترین فراوانی مربوط به ژن *pap* با (۳۳/۳۳) درصد در نمونه‌های طیور و (۱۳/۸) درصد در نمونه‌های انسانی گزارش شد.

نتیجه‌گیری: روش PCR راهی در جهت تشخیص سریع فاکتور های حدت در *اشریشیاکلی* جدا شده از نمونه های دامی و انسان بوده که می‌توان از نحوه انتشار و منشاء آلودگی، جهت بررسی‌های اپیدمیولوژیکی و مبارزه سریع با بیماری استفاده نمود.

کلیدواژگان

اشریشیاکلی اوروپاتوژنیک (UPEC)، ژنهای حدت، Multiplex- PCR.

* نویسنده مسئول، رایانامه: Moradli.mic@gmail.com

مقدمه

باکتری *اشریشیاکلی* بعنوان مهم ترین عضو خانواده انتروباکتریاسه روده انسان‌ها، پرندگان و پستانداران شناخته شده است. این باکتری بیماریزای فرصت طلب، به صورت ثانویه پس از سرکوب سیستم ایمنی میزبان و وقوع بیماری اولیه ویروسی و مایکوپلاسمایی بروز کرده و موجب ایجاد بیماریهای عفونی حاد می‌گردد. طیف وسیعی از عفونت های خارج روده ای چه در انسان و چه در حیوانات به وسیله سویه های *اشریشیاکلی* خارج روده ای EXPEC[1] از جمله ایجاد می شوند. از آن جمله می توان به سویه های APEC[2] (عامل بیماریزای طیور) وUPEC[3] (عامل عفونت دستگاه ادراری در انسان) اشاره نمود (۲و۱). *اشریشیاکلی* اوروروپاتوژن عامل اولیه عفونت مجاری ادراری که شامل سیستیت و پیلونفریت می باشد و گروهی از فاکتورهای ویرولانس را فعال می کند که رشد باکتری را آسان می کند و سبب مقاومت باکتری در داخل مجاری ادرار می گردد(۴و۳). عفونتهای دستگاه ادراری ناشی از *اشریشیاکلی* یکی از شایع ترین عفونتها در نوزادان و کودکان می باشد که ژنهای *sfa*و *pap* از عوامل مهم پاتوژنیسیته و به ویژه کلونیزاسیون و اتصال به سلولهای اپیتلیال می‌باشند. چندین ژن مسئول کد کردن فاکتورهای ویرولانس *اشریشیاکلی* از قبیل همولیزین (ژن *hly*)، فاکتور نکروز کننده سیتوتوکسیک تیپ ۱ (ژن *cnf-1*)، پیلی مرتبط با پیلونفریت (ژن *pap*)، آدهزین های خانواده S (ژن *sfa*) و آدهزین افیمبریه (ژن *afa*) هستند، که نقش مهمی در بیماریزایی سویه های ایجاد کننده عفونت مجاری ادراری ایفا می کنند(۵). بدنبال عفونت کلی باسیلوز در گله و در مرغانه ۴ تا ۱۲ هفته و بوقلمون‌های ۴ تا ۸ هفته دیده می‌شود. از علایم ابتلا به کلی باسیلوز مصرف دان خیلی کم در طیور، بعضاً عطسه و سرفه و طیور وزن خوبی ندارند. غالباً سویه های بیماریزای APEC بواسطه ۵ ژن حدت از ۸ ژن شناخته شده *cva/cvi* و *vat* ،*tsh* ،*iucD*،*papC*،*irp2*،*iss* ،*atsA* مشخص می گردند(۷و۶). این ژنها به ترتیب نقش هایی مانند استقرار باکتری در دیواره روده و تهاجم، افزایش پایداری کلی باسیل و جلوگیری از فعالیت کمپلمان، سیستم جذب آهن، عامل چسبندگی فیمبریه P، کد کننده پروتئین آئروباکتین، رشد و گسترش ضایعات رسوب فیبرین در کیسه های هوایی، واکوئله کردن و انتقال سایتوتوکسین و تولید کلی سین باکتریایی را بر عهده دارند(۸و۷). هدف از این مطالعه جدا سازی مولکولی ژنهای چسبندگی، نکروز کننده و همولیزین پاتووارهایUPEC, APEC /*اشریشیاکلی* جدا شده از انسان و طیور است.

روش بررسی

جمع آوری نمونه

در این مطالعه توصیفی مقطعی که در سال ۱۳۹۴ انجام شد، مجموعاً ۲۰۷ نمونه بالینی از بیماران دارای عفونت ادراری پذیرش شده در بیمارستانهای کرمان و نمونه‌های کلی‌باسیلوز جداشده از طیور (از بانک سویه های دانشکده دامپزشکی استان کرمان) جمع‌آوری و جداسازی شده وبعد از انجام آزمونهای تاییدی در نهایت ۷۲ ایزوله *اشریشیاکلی* از نمونه انسانی و طیور شناسایی شد. این نمونه‌ها بر روی محیطهای مک کانکی آگار، EMB آگار و کروم آگار *E.coli* انتقال داده شده و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شدند. بعد از شناسایی *E.coli*، آزمون‌های بیوشیمیایی تست کاتالاز، اکسیداز، سیترات، اوره آز، تخمیر قند، SIM، IMViC ، MR-VP و TSI[4] جهت تایید نهایی استفاده شد.

1. Extra- intestinal Pathogenic *E.coli*
2. Avian Pathogenic *E.coli*
3. Uropathogenic *E.coli*

4. Triple Sugar Iron Agar

استخراج DNA و واکنش زنجیره ای پلیمراز

استخراج DNA با استفاده از روش Crude Nucleic Acid Extraction انجام شد(۹). در این روش یک لوپ باکتری را در محلول TE به صورت سوسپانسیون در آورده و این سوسپانسیون را به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و در مرحله بعد بقایای سلولی توسط عمل سانتریفوژ رسوب داده شد. مایع رویی حاوی DNA به ویال دیگری منتقل گردید. غلظت و میزان خلوص DNA توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل ۲/۵میکرولیتر بافر ۱۰X ، ۰/۵ میکرولیتر $Mgcl_2$ با غلظت ۱۰۰mm، ۰/۵میکرولیتر dNTP با غلظت mm ۲۰، ۱ میکرولیتر از غلظت pmol ۱۰ از هر یک از آغازگرها (جدول-۱)، یک واحد آنزیم *Taq polymerase* و یک میکرولیتر از DNA ژنومی که با آب مقطر دو بار تقطیر به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. واکنش زنجیره ای پلیمراز در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، باز شدن دو رشته در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در دمای اتصال ۶۳ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و پلیمریزاسیون در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت مرحله طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه تکثیر یافت. برای مشاهده نتیجه تکثیر هر یک از ژنهای مورد مطالعه، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۲٪ در شرایط ۱۵۰ ولت در بافر TBE×10 تجاری (Fermentase, USA) انجام شد (۱۲-۱۰). از باکتری *اشریشیاکلی* pap فیمبریه‌دار سویه O_1 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد مطالعه در این تحقیق

ژن	توالی نوکلئوتیدی	اندازه قطعه bp	منبع
pap	F-GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G R-ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AATA	۳۲۸	(۱۲-۱۰)
sfa	F-CTC CGAGAACTGGGTGCATCTTAC R-CGG AGGAGT AA TTA CA AACCTGGCA	۴۱۰	(۱۲-۱۰)
afa	F-GCTGGGCAGCAAACTGATAACTCTC R-CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	۷۵۰	(۱۲-۱۰)
hly	F-AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT R-ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	۱۱۷۷	(۱۲-۱۰)
cnf	F-AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG R-TGGAGTTTCCTATGCAGGAG	۴۹۸	(۱۲-۱۰)

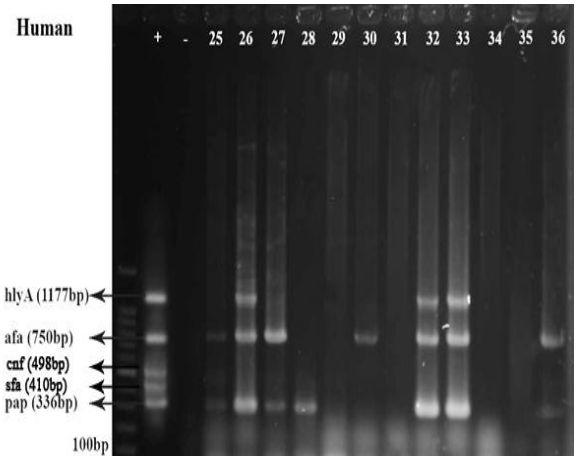
یافته‌ها

از مجموع کل ۲۰۷ نمونه جمع‌آوری شده، ۱۲۲ نمونه بالینی بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه ها ۶۹/۶۸ درصد دارای جنسیت زن (۸۵ نمونه) و ۳۰/۳۳ درصد مرد (۳۷ نمونه) بودند. میانگین سنی بیماران مراجعه کننده ۳/۲ ± ۴۷ سال بود که در نهایت ۳۶ نمونه از افراد مبتلا باکتری *اشریشیاکلی* جداسازی گردید. همچنین ۸۵ نمونه از طیور مبتلا به عفونت کلی باسیلوز باکتریایی نمونه‌برداری و پس از انجام آزمونهای لازم ۳۶ ایزوله *اشریشیاکلی* شناسایی قطعی شد. همانگونه که در جدول شماره ۲ نشان داده شده

است، بر اساس نتیجه آزمایش Multiplex-PCR جهت شناسایی ژن های حدت *pap*، *sfa*، *afa*، *hly* و *cnf*، مشخص گردید که در ۷۲ جدایه مورد مطالعه (انسانی و طیور)، ۳۲ جدایه از نظر وجود ژنهای حدت مثبت بودند که تعداد ۱۰ نمونه ۲۷/۷ درصد حاوی ژنهای حدت در نمونه‌های طیور و ۲۲ جدایه ۶۱/۱ درصد در انسان مثبت بودند. ژنهای *cfa* و *cnf* در هیچ یک از نمونه‌های انسانی و طیور ردیابی نگردید. تصاویر ۱ و ۲ نتیجه آزمایش PCR بر روی تعدادی از جدایه های مثبت درر نمونه‌های انسانی و طیور و همچنین جدول ۲ نتیجه آزمایش PCR جهت شناسایی جدایه های مثبت از نظر عوامل حدت باکتری *اشریشیاکلی* را نشان می دهد.

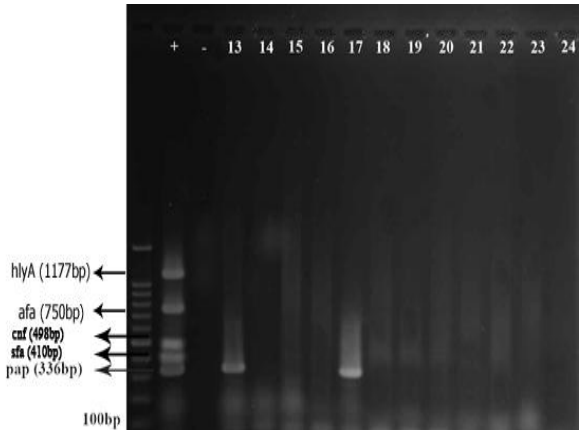
جدول۲- تعداد و درصد ژنهای حدت شناسایی شده با روش PCR در انسان و طیور

ژن های فیمبریه	*pap*	*sfa*	*Afa*	*hly*	*cnf*	کل
تعداد در انسان	۵	۰	۴	۱	۰	۱۰
درصد	۱۳/۸	۰	۱۱/۱۱	۲/۷	۰	۱۰۰
تعداد در طیور	۱۲	۰	۳	۷	۰	۲۲
درصد	۳۳/۳۳	۰	۸/۳	۱۹/۴۴	۰	۱۰۰



شکل ۱- نتایج آزمون PCR برخی از نمونه‌های انسانی به ترتیب از چپ به راست مارکر bp ۱۰۰، + کنترل مثبت شامل باکتری *اشریشیاکلی* واجد ژنهای حدت مورد مطالعه، - کنترل منفی شامل باکتری کلبسیلا ، چاهک ۳۲،۳۰،۲۸،۲۷،۲۶،۲۵، ۳۳ و ۳۶ جدایه های مثبت از نظر ژن های *pap*، *saf* و hly.

نمونه‌های طیور



شکل ۲- نتایج PCR در برخی از نمونه‌های طیور، به ترتیب از چپ به راست مارکر bp ۱۰۰، + کنترل مثبت شامل باکتری *اشریشیاکلی* واجد ژنهای حدت مورد مطالعه، - کنترل منفی شامل باکتری کلبسیلا ، چاهک ۱۳ و ۱۷جدایه های مثبت از نظر ژن *pap*.

بحث

در مطالعه حاضر فیمبریه P به عنوان یکی از مهمترین ژن های حدت به میزان ۱۳/۸ درصد در انسان و۳۳/۳۳ درصد در طیور شناسایی گردید. میزان فراوانی ژن *afa* در مطالعه حاضر ۱۱/۱۱ در انسان و ۸/۳ درصد در طیور شناسایی شد. بر اساس نتایج این تحقیق ۲۷/۷ درصد از نمونه‌ها حاوی ژنهای حدت در نمونه‌های طیور و ۶۱/۱ درصد در انسان واجد ژن های حدت بودند. میزان شیوع ژن *hly* در مطالعه حاضر ۲/۷ درصد در انسان و ۱۹/۴۴ درصد در طیور شناسایی شد. با توجه به اینکه حضور این فیمبریه به عنوان یکی از مهمترین عوامل خطر در بروز عفونت بالارونده ادراری در انسان محسوب می‌گردد، لذا گزارشات زیادی در کشورهای مختلف پیرامون وجود این ژن در نمونه بیماران مبتلا به عفونت ادراری ناشی از *اشریشیاکلی* وجود دارد، در صورتی که گزارشات عفونت با این ژن در نمونه‌های طیور از آمار بالاتری برخوردار است. (۳و۱). *اشریشیاکلی* به عنوان یکی از مهمترین عوامل ایجاد عفونت های ادراری در انسان و عفونت های طیور محسوب می‌گردد. اکثر جدایه‌ها از

موارد عفونت‌های ادراری واجد ژن های حدت خاصی می باشند و مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی متعددی در زمینه کشف و شناسایی این عوامل حدت صورت می گیرد که غالب این مطالعات در زمینه شناسایی عوامل حدت در پاتوژنز عفونت های ادراری به عنوان یک عفونت بالا رونده نقش دارند.

در مطالعه‌ای که در شهر ساوپاولو برزیل توسط Tiba و همکاران (۲۰۰۸) انجام شده فراوانی ژن های *papE/F* (۳۲/۷ درصد)، *sfaD/E* (۲۷/۸ درصد) و *afaB/C* (۶/۲ درصد) برآورد شده است(۱۳). بررسی دیگری در کشور برزیل توسط Santo و همکاران (۲۰۰۶) صورت گرفت که از ۱۰۰ ایزوله *اشریشیاکلی* ۱۲ جدایه واجد هر دو ژن *pap* و *sfa* و یک جدایه نیز واجد هر دو ژن *sfa* و *afa* بود(۱۴). در کشور اسلوونی نیز مطالعه ای توسط Rijavec و همکاران (۲۰۰۸) بر روی ۱۰۵ جدایه *اشریشیاکلی* صورت گرفت که ۵۵ درصد از جدایه ها واجد ژن *papC*، ۱۴ درصد واجد ژن *papGIII*، ۲۴ درصد واجد ژن *sfa/foc* و ۳ درصد نیز واجد ژن *afa* بود (۱۵). در ترکیه مطالعه ای که Arisoy و همکاران (۲۰۰۸) بر روی فاکتورهای حدت *اشریشیاکلی* انجام دادند از ۱۳۶ باکتری مورد آزمایش ۶ جدایه واجد ژن *pap*، ۵ جدایه واجد ژن *afaI* و ۲ جدایه نیز واجد ژن *sfa* بود(۴). همچنین ۳ جدایه دارای ترکیب ژنی *sfa+pap* بود. فراوانی ژن های بررسی شده در مطالعه حاضر هم خوانی بیشتری با یافته های Arisoy و همکاران (۲۰۰۸) را نشان می دهد(۴). در ایران مطالعه ای که Farshad و همکاران (۱۳۸۸) بر روی ارزیابی اپیدمیولوژیک ژنهای ویرولانس*pap*, *sfa*, *cnf-1*, *hiy* در سویه های *اشریشیاکلی* جدا شده از کودکان مبتلا به عفونت ادراری انجام دادند در صدد شیوع ژنهای *hly*, *sfa*, *pap* *cnf-1*, به ترتیب در میان سویه ها ۲۷/۱ درصد، ۱۴/۶ درصد، ۱۳/۵ درصد، ۲۲/۹ درصد، بود. ۳۲ نمونه (۳۳/۳ درصد) برای حداقل یکی از ژن ها و ۶ نمونه (۶/۳ درصد) برای تمامی چهار ژن مثبت بودند. شایع ترین ژن ها *pap/sfa* بودند که در بین گروه های سنی بالای ۳۶ ماه بیشترین مقدار را داشتند(۱۶). در ایران Nateghi و همکاران (۱۳۸۹) با بررسی حضور ۸ ژن *اشریشیاکلی* اوروپاتوزنیک انسان و با توجه به شناسایی ژن های *astA*, *iss*, *irp2*, *papc*هر دو سویه UPEC APEC, نتیجه گیری نمودند که این ژن ها می توانند به عنوان عوامل موثر در عفونت های خارج روده ای مطرح باشند، که از این میان ژن *iss* به دلیل دارا بودن بیشترین شیوع در هر دو سویه نیز ژن *irp2* با فراوانی ۳۳ درصد در سویه های UPEC با احتمال بیشتری می‌توانند به عنوان مهمترین عوامل بیماری زا در سویه های *اشریشیاکلی* معرفی شوند بعد از انجام M-PCR مشخص شد که ژن *papc* در ایجاد عفونت ادراری بسیار موثر می باشد(۱۷). Arabi و همکاران (۲۰۱۱) در پژوهشی بر روی ژنوتیپ فیمبریه مشترک در عفونت ادراری *اشریشیاکلی* کار کردند و از ۳۴۳ سویه باکتری اشرشیاکلی ایزوله شده توزیع ژن های فیمبریه *afa*, *pap*, *sfa* بیشترین فراوانی را در تولید عفونت ادراری بعد از آزمایش PCR داشتند که به ترتیب ۸۷/۷ درصد (۳۰۱) و ۲۳/۹ درصد (۱۱۳) و ۱۶/۶ درصد می باشد(۱۸). Shetty و همکاران (۲۰۱۳) بر روی ژن های حدت عفونت ادراری *اشریشیاکلی* در سویه های جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در مانگولور بررسی کردند و بعد از انجام PCR دریافتند بالاترین شیوع از آن ژن های *pap*, *afa*, *sfa* بوده است(۱۹). مطالعه Bahalo و همکاران (۲۰۱۳) بر روی بررسی فاکتورهای حدت جداسازی شده از *اشریشیاکلی* در کودکان مبتلا به عفونت ادراری در شهرکرد به وسیله مولتی پلکس PCR دریافتند که از مجموع ۱۰۰ *اشریشیاکلی* ایزوله شده بالاترین فراوانی را ژن های *sfa* و *pap* دارا هستند(۲۰). در تحقیقی Tarchounaو همکاران (۲۰۱۳) توزیع ژن های حدت تولید کننده عفونت ادراری در *اشریشیاکلی* ایزوله شده

از بیماران در طول دوره عفونت ادراری را بررسی کردند و اعلام داشتند که بالاترین شیوع ژن های کد کننده فیمبریه در عفونت های ادراری مربوط به ژن های *pap*, *afa*, *sfa* می باشد (۱۱).

با توجه به شناسایی ژن های *pap*، *sfa*، *afa*، *hly* و *cnf* در هر دو سویه APEC وUPEC ، می توان نتیجه گیری نمود که این ژن ها می توانند به عنوان عوامل موثر در حضور خارج روده ای باکتری مطرح باشند. از این میان ژن*pap* به دلیل دارا بودن بیشترین شیوع در هر دو سویه و نیز ژن*hly* با فراوانی ۱۱٪ در سویه های APEC وUPEC با احتمال بیشتری می توانند به عنوان مهم ترین عوامل بیماریزای در سویه های *اشریشیا کلی* معرفی شوند.

نتیجه گیری

بر طبق مطالعات انجام شده و مقایسه آن با دستاوردهای این پژوهش میزان ژن *pap* در همه جدایه ها بیشترین درصد فراوانی را به خود اختصاص داده و ژن های فیمبریه و *hly* و سپس *Afa* در رتبه های بعدی قرار گرفته‌اند، لذا احتمال می‌رود که این سه ژن از فاکتورهای اصلی حدت *اشریشیاکلی* بوده که قادر به ایجاد عفونتهای ادراری پیشرونده می باشند و در بیشتر مطالعات ژن های *pap* و *sfa* دارای ترکیب ژنی می باشند که مقایسه مطالعات پیشین با مطالعه حاضر نشان داد که بیشترین عفونت ادراری در بین جمعیت زنان وجود داش ته و موثرترین ژن در ایجاد عفونت ادراری ژن *pap* می‌باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از زحمات کلیه عزیزان در حوزه پژوهش دانشگاه آزاد داسلامی واحد ساوه و گروه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد قدردانی می‌گردد.

منابع و مآخذ

1. Ewers C, Janßen T, Wieler L. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2002;116(9-10):381-95.
2. Lane M, Mobley H. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. Kidney int. 2007;72(1):19-25.
3. Arisoy M, Aysev D, Ekim M, Özel D, Köse S, Özsoy E, et al. Detection of virulence factors of *Escherichia coli* from children by multiplex polymerase chain reaction. Int J Clin Pract. 2006;60(2):170-3.
4. Arısoy M, Rad AY, Akın A, Akar N. Relationship between susceptibility to antimicrobials and virulence factors in paediatric *Escherichia coli* isolates. Int J Antimicrob Agents. 2008;31:4-8.
5. Mabbett AN, Ulett GC, Watts RE, Tree JJ, Totsika M, Cheryl-lynn YO, et al. Virulence properties of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol. 2009;299(1):53-63.
6. Kwon S-G, Cha S-Y, Choi E-J, Kim B, Song H-J, Jang H-K. Epidemiological prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* differentiated by Multiplex PCR from commercial chickens and hatchery in Korea. J Bacteriol Virol. 2008;38(4):179-88.
7. Janßen T, Schwarz C, Preikschat P, Voss M, Philipp HC, Wieler LH. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. Int J Med Microbiol. 2001:31;291(5):371-8.
8. Ewers C, Janßen T, Kießling S, Philipp H-C, Wieler LH. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. Vet Microbiol. 2004;104(1):91-101.
9. Holmes DS, Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal Biochem. 1981;114(1):193-7.
10. Yuri K, Nakata K, Katae H, Yamomoto S, Hasegawa A. Distribution of uropathogenic virulence factors among *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. J vet Med sci. 1998;60(3):287-90.
11. Tarchouna M, Ferjani A, Ben-Selma W, Boukadida J. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. Int J Infect Dis. 2013;17(6): 450-e3.
12. Abe CM, Salvador FA, Falsetti IN, Vieira MA, Blanco J, Blanco JE, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008;52(3):397-406.
13. Tiba MR, Yano T, Leite DdS. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. Rev Instituto Med Trop Bras. 2008;50(5):255-60.
14. Santo E, Macedo C, Marin JM. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a university hospital in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Rev Instituto Med Trop Bras. 2006;48(4):185-8.
15. Rijavec M, Müller-Premru M, Zakotnik B, Žgur-Bertok D. Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. J Med Microbiol. 2008;57(11):1329-34.
16. Farshad S, Emamghorashi F, Amin Shahidi M. Epidemiologic evaluation of virulence genes, *pap* ،*sfa* ، *cnf-1* ،*hly* in *E.coli* strains isolated from children withurinary tract infection. Iranian J Med Microbiol. 2009;2(3):31-7. [In Persian]
17. Nateghi F, Jafarpour M, Nazemi A. Survey for Detection of Eight Correlated Genes of Avian Pathogenic *Escherichia coli* in HumanbUropathogenic *Escherichia coli*. J Microb World. 2010;3(3):169-76. [In Persian]

18. Arabi S, Tohidi F, Naderi S, Nazemi A, Jafarpour M ,Naghshbandi R. The common fimbarie genotyping in Uropathogenic *Escherichia coli.* Ann Biol Res. 2012;3(10):4951-4.

19. Shetty A, Kumar S, Shekar M, Shetty A, Karunasagar I. Prevalence of adhesive genes among uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infection in Mangalore. Indian J Med Microbiol. 2014;32(2):175.

20. Bahalo S, Tajbakhsh E, Tajbakhsh S, Momeni M, Tajbakhsh F. Detection of some virulence factors of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection isolated of children in Shahrekord Iran by multiplex PCR. Middle-East J Sci Res. 2013;14(1):29-32.