

تعیین پاتوتیپ جدایه‌های اشریشیا کلی از گوساله و طیور در ایران با استفاده از روش ریز آرایه DNA

حمید استاجی^۱، تقی زهرایی صالحی^{۲*}، اکبر مهدیزاده دستجردی^۳، آلفردا تونلی^۴

(۱) گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان - ایران.

(۲) گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(۳) گروه ویروس شناسی، موسسه تحقیقاتی VLA، ویرج، انگلستان.

(۴) گروه بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقاتی IZS، ترامو، ایتالیا.

(دریافت مقاله: ۲۵ اردیبهشت ماه ۱۳۹۰، پذیرش نهایی: ۲ مرداد ماه ۱۳۹۰)

چکیده

زمینه مطالعه: ردیابی ژن‌های مربوط به عوامل حداث که در یک سویه از اشریشیا کلی حضور دارند جهت تعیین پروفایل ژنوتیپی و همچنین قرارگیری سویه در پاتوتیپی خاص از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است. **هدف:** هدف از انجام این مطالعه تعیین پاتوتیپ جدایه‌های مختلف E. coli جدا شده از گوساله‌ها و طیور بومی ایران با استفاده از تکنیک ریز آرایه می باشد. **روش کار:** در مطالعه حاضر تعداد ۶۷ جدایه از اشریشیا کلی پس از جداسازی، با استفاده از روش نوین ریز آرایه DNA Microarray (DNA) جهت تعیین پاتوتیپ هر جدایه مورد بررسی قرار گرفتند. در آرایه مورد استفاده پروب‌های ژنی مرتبط با ۲۶۳ فاکتور حداث مختلف اشریشیا کلی قرار داشتند. **نتایج:** نتایج حاصل نشان دهنده این امر بود که از سویه‌های جدا شده از اسهال گوساله‌ها، ۴۷ درصد به پاتوتیپ EPEC، ۶۸/۱۵ درصد به پاتوتیپ EPEC، ۶۸/۱۵ درصد پاتوتیپ UPEC، ۹۶/۱ درصد به پاتوتیپ ETEC، ۹۶/۱ درصد ترکیبی از پاتوتیپ‌های EPEC و UPEC بوده و ۱۷/۶۴ درصد سویه‌ها غیر قابل اختصاص به پاتوتیپی خاص بودند و در مورد سویه‌های جدا شده از کلی باسیلوز طیور ۶۲/۵ درصد به پاتوتیپ APEC، ۲۵/۳۱ درصد به پاتوتیپ ExPEC و ۶/۲۵ درصد سویه‌ها غیر قابل اختصاص به پاتوتیپ خاصی بودند. **نتیجه‌گیری نهایی:** مطالعه حاضر نشان دهنده این امر می باشد که روش نوین ریز آرایه DNA در مقایسه با روش‌های مولکولی مرسوم قادر است تعداد بالایی از ژن‌های حداث را در یک زمان و در مدت زمان کوتاهی بخوبی ردیابی کرده و در تعیین پروفایل ژنتیکی و تعیین پاتوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: اشریشیا کلی، عوامل حداث، پاتوتیپ، روش ریز آرایه DNA.

نموده (۹،۲۲) و منجر به ایجاد پاتوتیپ‌هایی متفاوت با ترکیب ژن‌های حداث جدید گردد (۲۴).

سویه‌های مختلف اشریشیا کلی بر اساس حضور یا عدم حضور عوامل حداث، نوع آنها و همچنین علایم بالینی ایجاد شده در میزبان به پاتوتیپ‌های مختلفی تقسیم بندی می شوند که عبارتند از:

EPEC (Enteropathogenic *E. coli*) عامل ایجاد کننده اسهال در اطفال و حیوانات، EHEC (Enterohemorrhagic *E. coli*) عامل ایجاد کولیت خونریزی دهنده و سندروم همولیتیک-اورمیک در انسان، ETEC (Enterotoxigenic *E. coli*) عامل بیماری اسهال مسافران در انسان و اسهال گاو و خوک، EAEC (Enterotoxigenic *E. coli*) عامل ایجاد اسهال پایدار در انسان، DAEC (Detaching-Affacing *E. coli*) بعنوان زیبرده‌ای از پاتوتیپ EAEC و مسئول ایجاد اسهال در اطفال، EIEC (Enteroinvasive *E. coli*) عامل اسهال آبکی و دیسانتری در انسان، UPEC (Uropathogenic *E. coli*) عامل ایجاد عفونت‌های دستگاه ادراری در انسان و حیوانات، NMEC (Neonatal meningitides *E. coli*) عامل ایجاد کننده عفونت خونی و مننژیت در نوزادان انسان و حیوانات و APEC (Avian pathogenic *E. coli*) عامل ایجاد کننده بیماری کلی باسیلوزیس در طیور با علایم تورم کیسه‌های هوایی، سلولیت

مقدمه

گونه اشریشیا کلی (*E. coli*) با کتری میله‌ای شکل و گرم منفی از خانواده آنترروباکتریاسه می باشد که بصورت همزیست درون دستگاه گوارش انسان و حیوانات خونگرم زندگی می کند (۲۳). سویه‌های بیماری‌زای این باکتری در مقایسه با سویه‌های غیر بیماری‌زا واجد عوامل حداث خاصی هستند که آنها را قادر می سازد طیف وسیعی از بیماری‌ها را در انسان و حیوانات (۱) از قبیل اسهال، عفونت‌های دستگاه ادراری، باکتری می و مننژیت نوزادان ایجاد کنند (۲۳). سویه‌های بیماری‌زای اشریشیا کلی را می توان بواسطه حضور ژن‌های حداث که رمزکننده عوامل اتصالی و موضعی شدن باکتری، تهاجم، مولکول‌های سطحی، مواد ترشچی، ترکیبات انتقال دهنده متابولیت‌ها و سیدروفورها هستند، از انواع غیر بیماری‌زا متمایز نمود (۱۱). ژن‌های حداث معمولاً درون جزایر بیماری‌زایی کروموزوم، پلاسمیدها و یافاژها که جزء عناصر ژنتیکی سیار و قابل انتقال هستند، قرار می گیرند (۲،۱۳) و به همین دلیل ژنوم اشریشیا کلی از لحاظ حضور ژن‌های حداث مختلف بسیار متنوع بوده و این خصوصیات باعث می شود باکتری، ژن‌هایی را از دست داده و یا از دیگر سویه‌های بیماری‌زای گونه اشریشیا کلی طی روندی تحت عنوان انتقال جانبی ژن‌ها کسب



ذکر شده و موارد واکنش مثبت به رنگ قرمز، واکنش منفی به رنگ سبز و موارد مشکوک به رنگ سیاه به نمایش گذاشته شده‌اند و بدلیل حجم و اندازه بالای تصویر اخذ شده فقط بعنوان نمونه قسمتی از تصویر دریافتی به نمایش درآمده است. در جدول ۲ فقط ژن‌های حدت اختصاصی موجود در پاتوتیپ‌های خاص که در نمونه‌ها ردیابی شدند نمایش داده شده‌اند و قابل ذکر است که ژن‌های حدت مشترک بین پاتوتیپ‌های مختلف که در نمونه‌ها ردیابی شده‌اند به منظور فشرده‌سازی نتایج در جدول ۲ و محدودیت در فضای نوشتاری از ذکر آنها در جدول نتایج خودداری شده است.

پس از انجام آزمون ریزآرایه DNA جهت تعیین پاتوتیپ جدایه‌های *E. coli* از موارد اسهال گوساله‌ها، نتایج به این ترتیب می‌باشد که ۴۷ درصد سویه‌ها مربوط به پاتوتیپ EHEC، ۱۵/۶۸ درصد مربوط به پاتوتیپ EPEC، ۱۵/۶۸ درصد مربوط به پاتوتیپ UPEC، ۱/۹۶ درصد مربوط به پاتوتیپ ETEC، ۱۷/۶۴ درصد غیرقابل اختصاص به پاتوتیپی خاص و یک مورد (۱/۹۶ درصد) از لحاظ حضور پروب‌های اختصاصی هر دو پاتوتیپ EPEC و UPEC مثبت شناسایی شده و در مورد نمونه‌های اخذ شده از طیور ۶۲/۵ درصد مربوط به پاتوتیپ APEC، ۳۱/۲۵ درصد مربوط به پاتوتیپ ExPEC و در یک مورد (۶/۲۵ درصد) ژن‌های پاتوتیپی خاص ردیابی نشده و قابل اختصاص به هیچ پاتوتیپی نبود.

در مورد سویه‌های جدا شده از موارد بالینی اسهال گوساله‌ها، پاتوتیپ EHEC در سروتیپ‌های O45, O157, O44, O55, O26, O18, O111, O113 (IpfA) مثبت بوده و احتمالاً به این سروتیپ تعلق دارد، مشاهده شده و پاتوتیپ EPEC در سروتیپ‌های O2, O44, O20, O111, O26 قرار داشته و اعضای پاتوتیپ UPEC در سروتیپ‌های O2, O44, O45 و همچنین یک نمونه بعنوان پاتوتیپ ETEC تعیین شد که سروتیپ آن مشخص نبوده و در یک نمونه نیز ژن‌های اختصاصی مربوط به پاتوتیپ‌های EPEC و UPEC ردیابی شد که احتمالاً در آن نمونه سویه‌های مربوط به هر دو پاتوتیپ حضور داشته‌اند. از موارد اشریشیا کلی مربوط به اسهال گوساله‌ها ۹ جدایه بدلیل عدم حضور و یا اندک بودن ژن‌های اختصاصی پاتوتیپی خاص به هیچ یک از پاتوتیپ‌ها اختصاص نداشتند.

در جدایه‌های مربوط به کلی باسیلوز طیور نیز پاتوتیپ‌های APEC و ExPEC در هر دو سروتیپ O2 و O78 مشاهده شده و یک نمونه نیز بدلیل عدم ردیابی ژن‌های اختصاصی پاتوتیپی خاص، قابل اختصاص به هیچ یک از پاتوتیپ‌ها نمی‌باشد.

بحث

ردیابی تعیین کننده‌های حدت که در ژنوم اشریشیا کلی بیماریزا قرار دارند جهت تعیین پاتوتیپ ایجاد کننده بیماری و علایم بالینی در میناز از

SlideBooster® (Advalytix, ABI, Milan, Italy) قرار گرفته و پس از آن نمونه نشان‌گذاری شده درون بافر آمیخته‌گری روی آرایه قرار داده شده و اسلایدها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد جهت تکمیل مرحله آمیخته‌گری، گرم خانه‌گذاری می‌شدند. پس از طی مدت زمان آمیخته‌گری لام‌ها با استفاده از محلول (ABI, Milan, Italy) Advawash® (Advalytix, 1X SSC, 0.02% SDS) حاوی ۵۰ درجه سانتیگراد رسیده بود شستشو شده و بلافاصله توسط دستگاه اسکنر ScanArray® و نرم افزار (Perkin Elmer, Milan, Italy) ScanArray Gx software® اسکن شده و تصاویر اخذ شده توسط نرم افزار QuantArray® (Perkin Elmer, Milan, Italy) جهت تعیین حضور ژن‌های حدت در نمونه‌ها بصورت تصویر ۱ توسط این نرم افزار کسب شده و مورد آنالیز قرار گرفتند.

نتایج

نتایج سروتایپینگ: تعداد ۶۷ سویه از باکتری اشریشیا کلی جدا شده از موارد اسهال گوساله‌ها (۵۱ جدایه) و کلی باسیلوز طیور (۱۶ جدایه) مطابق پروتکل ذکر شده تعیین سروتیپ شدند که نتایج آن در جدول ۲ و ذکر گردیده است. در بین سویه‌های جدا شده از موارد اسهال گوساله‌ها سروتیپ‌های O2 (۷/۸۴ درصد)، O18 (۳/۹ درصد)، O20 (۳/۹ درصد)، O26 (۱۹/۶ درصد)، O44 (۲۳/۵۲ درصد)، O45 (۳/۹ درصد)، O55 (۱/۹۶ درصد)، O86 (۱/۹۶ درصد)، O111 (۱۵/۶۸ درصد)، O126 (۱/۹۶ درصد)، O157 (۳/۹ درصد) و در مورد برخی جدایه‌ها غیرقابل تعیین سروتیپ (۱۱/۷۶ درصد) مشاهده شده و در بین جدایه‌های مربوط به کلی باسیلوز طیور سروتیپ‌های O2 (۳۱/۲۵ درصد)، O78 (۴۳/۷۵ درصد) و غیرقابل تعیین سروتیپ (۲۵ درصد) مشاهده شدند.

تعیین پاتوتیپ جدایه‌ها با استفاده از روش ریزآرایه DNA: لام‌های ریزآرایه استفاده شده در این مطالعه توسط Bruant و همکاران در سال ۲۰۰۶ از لحاظ کارایی و توانایی در تعیین پاتوتیپ‌های اشریشیا کلی با استفاده از سویه‌های استاندارد با پاتوتیپ مشخص، ارزیابی شده‌اند و کارایی و صحت نتایج آنها مورد تایید قرار گرفته بود.

بعد از انجام آمیخته‌گری روی لام‌های ریزآرایه، تصویر اخذ شده از دستگاه اسکنر توسط نرم افزار Quantarray® مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و سپس با استفاده از نرم افزاری تحت زبان برنامه‌ریزی جاوا (Java) نتایج مطابق تصویر ۱ از این نرم افزار بصورت کلاستر (خوشه) اخذ شده و قابل ذکر است که تمامی نمونه‌های نام برده در جدول ۱ و ۲ با تمام چهار پروب مربوط به شاهد مثبت، واکنش مثبت نشان داده و با هیچ یک از پروب‌های شاهد منفی واکنشی نداشته و به این ترتیب در اولین مرحله اشریشیا کلی بودن آنها مورد تایید قرار گرفته و سپس از لحاظ حضور ژن‌های حدت قید شده در جدول مورد ارزیابی قرار می‌گرفتند. در تصویر یک در هر ستون ژن‌های مربوط به یک نمونه که مورد بررسی قرار گرفته‌اند



رسانده شده و با استفاده از دستگاه دسیکاتور (ArrayIt, USA) (Savant SpeedVac®) نمونه‌ها خشک شده و نهایتاً در آب مقطر با درجه خلوص بالا (GMBH, Germany) دوباره بصورت تعلیق درآمده و به حجم ۲۱ میکرولیتر رسانده شدند. سپس ژنوم استخراج شده از نمونه‌ها با استفاده از کیت نشان‌گذاری (Life Technologies, Milano, Italy) Invitrogens Bioprime® (Invitrogen توسط Bruant et al., 2006) نشان‌گذاری شدند. میزان کارایی روند نشان‌گذاری و درصد ورود رنگ در نمونه‌ها از طریق جذب نوری ژنوم نشان‌گذاری شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Nanodrop® در طول موج ۵۵۰ نانومتر و با استفاده از نرم افزار online مربوطه http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/percent_inc.html اندازه‌گیری شد. مطابق با مرجع (Bruant et al., 2006) نمونه‌هایی که درصد ورود رنگ در ژنوم نشان‌گذاری شده آنها بین ۱۰-۸ درصد باشد جهت انجام مراحل آمیخته‌گری مناسب هستند و برای انجام مراحل بعدی انتخاب می‌شدند.

ریزآرایه الیگونوکلئوتیدی ژن‌های حدت (probes Virulence genes oligonucleotide): Bruant و همکاران در سال ۲۰۰۶ یک ریزآرایه الیگونوکلئوتیدی را برای تشخیص پاتوتیپ‌های شناخته شده *E. coli* طراحی نمودند. در این آرایه پروب‌هایی متشکل از ۷۰ نوکلئوتید برای تعداد ۲۶۳ ژن حدت، مربوط به پاتوتیپ‌های مختلف (گونه اشتریشیاکلی) تعداد ۱۰۹ ژن حدت مشترک بین پاتوتیپ‌های مختلف و ۱۵۴ ژن حدت اختصاصی پاتوتیپ‌های خاص مطابق جدول یک) و بصورت دوبار تکرار (Duplicate) در سطح لام‌های میکروسکوپی حضور دارند که در مطالعه حاضر از این آرایه‌ها جهت تعیین پاتوتیپ جدایه‌های *E. coli* استفاده شد.

آمیخته‌گری (Hybridization): جهت انجام مراحل آمیخته‌گری از دستورالعمل ذکر شده مطابق پروتکل Bruant و همکاران در سال ۲۰۰۶ استفاده شد، به این ترتیب که برای انجام هر مرتبه آمیخته‌گری مقادیر ۵۰۰ نانوگرم از DNA نشان‌گذاری شده تحت شرایط خلاء درون دسیکاتور چرخشی (ArrayIt, USA) (Savant SpeedVac®) خشک شده و سپس نمونه‌های خشک شده درون بافر آمیخته‌گری حاوی ۴۰۰ میکرولیتر Dig Ease Buffer (Diagnostics s.p.a., Milano, Italy) ۲۰ میکرولیتر tRNA مخمر (Roche) و ۲۰ میکرولیتر DNA اسپرم ماهی سالمون سونیکه شده (Sigma Aldrich spa, Milano, Italy) (10 mg/ml) دوباره بصورت تعلیق درآمده و توسط این بافر به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده می‌شدند. قبل از انجام آمیخته‌گری، لام‌های ریزآرایه برای مدت زمان حداقل یک ساعت در بافر پیش آمیخته‌گری (1.0% BSA) و 5X SSC, 0.1% SDS and که قبلاً به دمای ۵۰ درجه سانتیگراد رسیده بودند قرار داده شده و پس از طی این زمان، آمیخته‌گری به این صورت انجام می‌گرفت که اسلایدهای حاوی پروب‌ها درون دستگاه آمیخته‌گری

و عفونت خونی، که البته سویه‌های بیماریزا در طیور را جزء *E. coli* بیماریزای خارج روده‌ای (*Extraintestinal pathogenic E. coli*) نیز دسته‌بندی می‌نمایند. (۱۹،۲۰،۲۷،۲۸،۳۳).

روش‌های متعددی جهت ردیابی *E. coli* بیماریزا شامل آزمون‌های نشانگرهای فنوتیپی و ژنوتیپی به منظور ردیابی ژن‌های حدت و محصولات آنها در دسترس بوده (۷،۲۱،۲۶،۳۱) و این روش‌ها قادرند که فقط تعداد محدودی از این عوامل حدت را در یک زمان تعیین نمایند (۱)، اما فن‌آوری ریزآرایه (DNA Microarray) یا فن‌آوری تراشه ژنی (DNA Chip) این امکان را فراهم می‌سازد که بصورت جامع، هزاران ژن را که پروب یا ردیف‌های آنها در سطح یک لام میکروسکوپی قرار گرفته‌اند، در یک زمان در یک سویه از *E. coli* غربالگری نموده و از آنها در گروه بندی و تمایز پاتوژن‌های باکتریایی و تعیین عوامل حدت آنها استفاده نمود (۱،۴،۱۲،۳۰،۳۱،۳۴،۳۵).

هدف از انجام این مطالعه تعیین پاتوتیپ سویه‌های *E. coli* جدا شده از نمونه‌های مربوط به اسهال گوساله‌ها و کلی باسیلوزیس طیور ار جاعی به آزمایشگاه گروه میکروبی شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران بود که این امر از طریق ردیابی تعداد ۲۶۳ عدد از ژن‌های مرتبط با عوامل حدت و انواع مختلف این عوامل از قبیل آدزین‌ها، سموم، ترکیبات دخیل در اخذ و انتقال آهن، عوامل رمز شده توسط جایگاه ژنی محو کننده آنتروسیت‌های روده، کلیسین‌ها (Colicins) و میکروسین‌ها (Microcins)، پادگن‌های سوماتیک و کپسولی، همولیزین‌ها و هماگلوتینین‌ها، عواملی با عملکردهای متفاوت و عوامل حدتی که اخیراً در این گونه شناسایی شده‌اند و می‌توانند در بیماریزایی دخیل باشند، انجام پذیرفت.

مواد و روش کار

جداسازی، تعیین سروتیپ و استخراج DNA از ژنوم سویه‌های اشتریشیاکلی: تعداد ۶۷ سویه از باکتری اشتریشیاکلی از گوساله‌های مبتلا به اسهال (۵۱ جدایه) و طیور مبتلا به کلی باسیلوزیس (۱۶ جدایه) براساس روش‌های کشت و بیوشیمیایی مرسوم جداسازی شده و سپس سروتیپ مربوط به هر جدایه با استفاده از آنتی سرم‌های اشتریشیاکلی بیماریزا، محصول شرکت (Diagnostics, EA) "MAST ASSURE" و مطابق با پروتکل آن تعیین شدند. سپس DNA ژنومی هر نمونه با استفاده از کیت AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (BIONEER, Korea) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد.

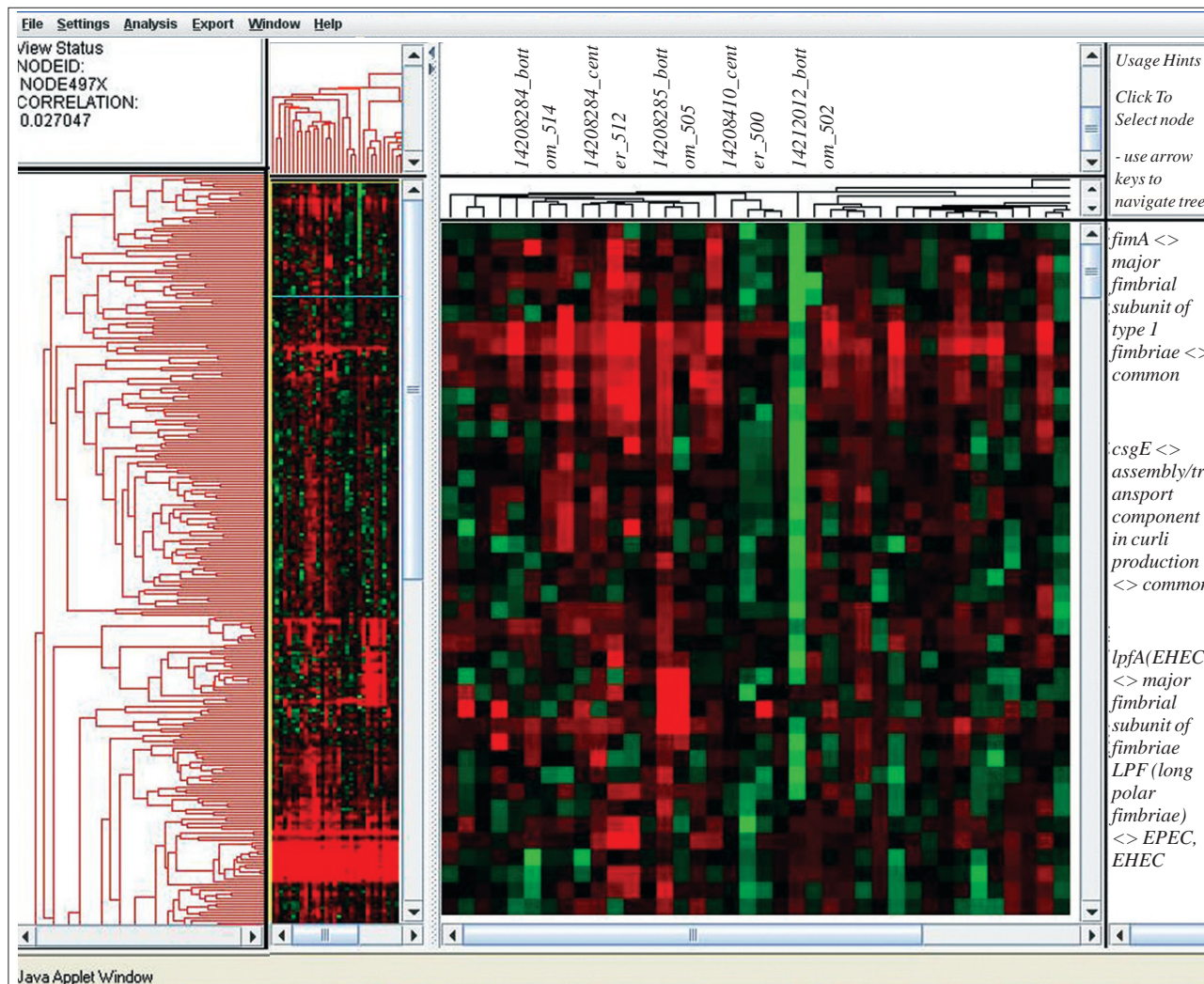
نشان‌گذاری (DNA Labelling): میزان کمی (DNA Quantity) استخراج شده از نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Nanodrop®) (Nanodrop Technologies, Celbio Srl., Milano, Italy) اندازه‌گیری شد. سپس مقادیر DNA در بازه ۳۰۰ نانوگرم تا ۳ میکروگرم از هر نمونه برداشت شده و به حجم ۲۱ میکرولیتر



جدول ۱- ژن های حدت اختصاصی ردیابی شده مربوط به پاتوتیپ های مختلف (اسهال گوساله ها).

پاتوتیپ	ژن های حدت اختصاصی ردیابی شده مربوط به پاتوتیپ های مختلف (اسهال گوساله ها)	سروتیپ	شماره نمونه
EHEC	<i>lpfA, lpfA(EHEC), efa1, eae, eae(beta), espA-1, espB-3, tir-1, paa, stx1A, stx1B, irp2, fyuA, wzy(O26), ehxA, cif, espP, malX, set, ureD, nleA(EHEC), nleB, nleE, nleF, nleG</i>	O18	37
نامشخص	<i>chuA, fepC, irp2, lpfA, eaf, ibeA, malX, tibC,</i>	O18	5-B
EPEC	<i>bfpA(beta), focG, lpfA(O113), afaE7, hra1,</i>	O2	237
UPEC	<i>chuA, fepC, iroN, fyuA, kpsM-II, fl65(1)A, papA(11), papC, malX, usp, papGII</i>	O2	C-A
UPEC	<i>chuA, iroN, fyuA, irp1, irp2, kpsM-II, papA(11), papC, malX, papGII</i>	O2	C-B
UPEC	<i>chuA, fepC, iroN, fyuA, irp1, irp2, kpsM-II, fl65(1)A, papA(11), papC, malX, tibC, usp, papGII</i>	O2	C-C
EHEC	<i>wzy(O86), lpfA, lpfA(O113), spaS</i>	O26	H
EHEC	<i>stx1A, fyuA, irp2, lpfA, lpfA(EHEC), ehxA, cif, efa1, espP, set, ureD, eae, eae(beta), espA-1, espB-3, ler, nleA(EHEC), nleB(O157), nleF, nleG, paa, spaS</i>	O26	D
EHEC	<i>wzy(O26), lpfA, lpfA(EHEC), capU, cif, efa1, set, shf, ureD, virK, eae, eae(beta), espA-1, espB-3, tir-1, nleA(EHEC), nleF, nleG, paa</i>	O26	C
EHEC	<i>stx1A, stx1B, fyuA, irp1, irp2, wzy(O26), lpfA(EHEC), cif, efa1, malX, set, ureD, eae, eae(beta), espA-1, espB-3, tir-1, ler, nleA(EHEC), nleF, nleG, paa</i>	O26	A
EHEC	<i>stx1A, stx1B, wzy(O26), lpfA, lpfA(EHEC), ehxA, efa1, espP, set, ureD, eae, eae(beta), espA-1, espB-3, tir-1, ler, nleA(EHEC), nleF, nleG,</i>	O26	L
EHEC	<i>stx1A, stx1B, fyuA, wzy(O26), lpfA, lpfA(EHEC), papA, cif, efa1, malX, tibC, set, ureD, eae, eae(beta), espA-1, espB-3, tir-1, ler, escJ, nleA(EHEC), nleB, nleC, nleF, paa, spaS</i>	O26	N
EHEC	<i>stx1A, stx1B, lpfA(EHEC), ehxA, cif, efa1, malX, set, ureD, eae, eae(gamma), espA-1, espB-2, tir-3, ler, escJ, nleB, paa,</i>	O26	36
EHEC	<i>stx1A, stx1B, wbdI, lpfA(EHEC), ehxA, cif, efa1, malX, tibC, set, ureD, eae(gamma), espA-1, espB-2, tir-3, ler, escJ, nleA(EHEC), nleB, nleC, nleG, paa, spaS,</i>	O26	32
EHEC	<i>stx1A, stx1B, fyuA, wzy(O26), lpfA(EHEC), ehxA, cif, efa1, espP, katP, malX, set, ureD, eae(beta), espA-1, espB-3, tir-1, ler, escJ, nleA(EHEC), nleB, nleC, nleG, spas</i>	O26	10-2
EHEC	<i>stx1A, stx1B, fyuA, irp2, wzy(O26), lpfA(EHEC), papA(7-2), papA(14), cif, efa1, malX, tibC, set, ureD, eae(beta), espA-1, espB-3, tir-1, tir-3, ler, escJ, nleA(EHEC), nleB</i>	O26	7-B
EHEC	<i>cnf2, stx1A, stx1B, wzy(O55), ralG, bfpA(alpha), bfpA(beta), CS3, lpfA(EHEC), papC, papGI, hlyA</i>	O55	801
نامشخص	<i>csgE, fimA, fimH, hlyE, fliC, gad, ompA, artJ, b1121</i>	O44	748
EPEC	<i>csgE, gafD, fimA, fimH, lpfA, hra1, agn43, fliC, gad, ibeB, ompA, artJ, mviM, mviN, tspE4.C2</i>	O44	373
UPEC	<i>chuA, fepC, iroN, kpsM-II, lpfA</i>	O44	20
EHEC	<i>stx1A, stx1B, chuA, fepC, fyuA, irp2, rfbE, lpfA(EHEC), ehxA, cif, efa1, espP, etpD, katP, malX, L7095, rtx, set, ureD, eae(beta), eae(gamma2), tir-1, ler, nleA(EHEC), paa</i>	O44	34
EHEC	<i>stx1A, chuA, lpfA, katP, ureD, eae, espA-2, espB-1, ler, escJ, nleA(EHEC), nleC, nleD,</i>	O44	33
EHEC	<i>chuA, fepC, rfbE, lpfA, ehxA, efa1, espP, etpD, katP, rtx, set, ureD, eae(gamma2), espA-2, espB-1, ler, escJ, nleB, nleC, nleD, nleF, paa</i>	O44	31
EHEC	<i>stx1A, chuA, lpfA, etpD, set, ureD, eae, espA-2, escJ,</i>	O44	3
نامشخص	<i>faeGac, tibC, spas</i>	O44	403
UPEC	<i>chuA, fepC, lpfA, papA(14), shf</i>	O44	805
نامشخص	<i>iroN, lpfA</i>	O44	800
EPEC	<i>lpfA, ehxA, cif, efa1, eae, eae(beta), espA-1, espB-3, tir-1, ler, nleF, paa,</i>	O44	738
نامشخص	<i>lpfA</i>	O44	737
نامشخص	<i>wzy(O86), fl65(1)A, lpfA, papA(11), papC, capU, espP, shf, virK</i>	O86	169
EHEC	<i>stx1A, stx1B, wbdI, lpfA(EHEC), ehxA, cif, efa1, set, ureD, eae(gamma), espA-1, tir-3, ler, nleB,</i>	O111	F
EPEC	<i>iroN, fl65(1)A, lpfA, papA(11), papC, papGII,</i>	O111	B4
EPEC-UPEC	<i>iroN, fl65(1)A, lpfA, papA(7-2), papA(11), papC, tibC, papGII, tir-3, spaS,</i>	O111	AB
EPEC	<i>fl65(1)A, lpfA, papC, espP,</i>	O111	8
EHEC	<i>stx1A, stx1B, wbdI, lpfA(EHEC), ehxA, cif, efa1, set, ureD, eae, eae(gamma), espA-1, tir-3, ler,</i>	O111	758
EHEC	<i>stx1A, stx1B, wbdI, lpfA, lpfA(EHEC), ehxA, set, ureD, eae, eae(gamma), espA-1, ler, nleB,</i>	O111	755





تصویر ۱- نتایج آزمون ریز آرایه اخذ شده از نرم افزار Quantarray® بصورت کلاستر به نمایش درآمده اند. در این تصویر در قسمت سمت چپ ژن های حدت مورد ردیابی بصورت ستونی ذکر شده اند و همانطور که در تصویر مشخص است ژن هایی که حضور آنها در یک نمونه به یکدیگر وابسته بوده و یا بهم نزدیک می باشند کنار یکدیگر از لحاظ فیلوژنیک قرار داشته و در قسمت بالایی تصویر شماره هر نمونه ذکر شده است. در این تصویر مربوط به کلاستر بصورت خودکار نمونه هایی که از لحاظ حضور ژن های حدت مختلف مشابه بوده و یا بهم نزدیک هستند نیز از لحاظ فیلوژنیک در یک گروه قرار می گیرند و هر چه نمونه ها از یکدیگر متفاوت تر باشند در این دسته بندی فیلوژنیک از یکدیگر دورتر قرار گرفته اند. در قسمت سمت راست تصویر نیز نام ژن های مورد بحث به همراه عملکرد هر ژن در سمت چپ آورده شده است. همچنین قابل ذکر است که در بخش رنگی سمت چپ داخل تصویر ۱، در قسمت پایین که پروب های شاهد مثبت قرار دارند، همه نمونه ها از حضور ژن های شاهد مثبت، مثبت نمایش داده شده اند که بنوعی صحت و کارایی این روش نوین را در ردیابی ژن های مختلف نشان می دهد.

کلی جدا شده از موارد مختلف بیماری های بالینی انسان و حیوانات پاتوتیپ اکثر سویه ها را مشخص نموده و همچنین آرایه های مورد نظر را با استفاده از سویه های استاندارد با پاتوتیپ مشخص ارزیابی نمودند و در مطالعات آنها برخی سویه ها غیر قابل تعیین پاتوتیپ بوده و یا به عبارتی به هیچ کدام از پاتوتیپ ها اختصاص نداشتند (۱،۲۳) که این حالت در مطالعه حاضر نیز رخ داده و از بین ۵۱ سویه مربوط به موارد اسهال گوساله ها ۹ مورد و از ۱۶ نمونه اشریشیا کلی جدا شده از کلی باسیلوز طیور یک مورد به هیچ یک از پاتوتیپ ها تعلق نداشتند.

Korczak و همکاران در سال ۲۰۰۵ با استفاده از روش ریز آرایه تعدادی از ژن های حدت مرتبط با سویه های بیماریزای روده ای و غیر روده ای *E. coli* را در جدایه های مختلف این باکتری با منشاء متفاوت ردیابی نموده و

اهمیت فوق العاده ای برخوردار بوده (۱) و تاکنون چندین ریز آرایه مرتبط با ژن های حدت اشریشیا کلی بمنظور تعیین ژنوتیپ سویه های اشریشیا کلی مورد استفاده قرار گرفته و در تمامی این مطالعات مشخص شده است که روش ریز آرایه DNA بدلیل ردیابی تعداد بالایی از ژن های حدت این باکتری بعنوان ابزار قدرتمندی با صحت و کارایی بالا در مقایسه با دیگر روش های مولکولی که در یک زمان قادرند فقط تعداد محدودی از ژن ها و فاکتورهای حدت را ردیابی نمایند مطرح می باشد (۳،۵،۱۶).

Muna F Anjum و همکاران در سال ۲۰۰۷ و همچنین Palaniappan و همکاران در سال ۲۰۰۶ با استفاده از طراحی نوعی آرایه DNA با فرمت داخل لوله ای و ردیابی تعدادی از ژن های حدت اختصاصی پاتوتیپ ها و تعدادی از ژن های مشترک توانستند با آزمون برخی سویه های اشریشیا



بعنوان پاتوتیپ بیماریزای خارج روده‌ای (ExPEC) در نظر گرفته شده‌اند.

ژن‌های رمزکننده عوامل حدت در *E. coli* روی کروموزوم، پلاسمید و فاژها قرار داشته و می‌توانند براحتی از طریق انتقال افقی به سویه‌های غیر بیماریزا منتقل شوند و با توجه به این واقعیت که تعداد عوامل حدت شناسایی شده و دخیل در بیماریزایی این باکتری بصورت روزافزون افزایش یافته و شناسایی آنها توسط روش‌های مولکولی سنتی که توانایی ردیابی تعداد اندکی از این عوامل را در یک زمان دارند و به تبع آن تعیین ژنوتیپ و پاتوتیپ یک سویه توسط آنها مشکل بنظر رسیده، کارایی چندانی ندارند و از طرفی تکنیک ریزآرایه DNA که قادر است حداقل هزاران ژن را در یک زمان ردیابی نماید بعنوان ابزار مناسب و قدرتمندی در تعیین پاتوتیپ و ژن‌های حدت سویه‌های مختلف اشریشیا کلی کاربرد دارد. روش ریزآرایه DNA استفاده شده در این تحقیق که برای اولین بار در ایران روی جدایه‌های اشریشیا کلی مربوط به اسهال گوساله و طیور بومی ایران انجام پذیرفت، توانست بیش از ۲۶۰ ژن حدت مربوط به گونه اشریشیا کلی را غربالگری کرده و در هر نمونه حضور یا عدم حضور هر یک از این ژن‌ها را در نمونه‌ها تعیین نماید.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و دانشکده دامپزشکی بخاطر تامین اعتبار طرح تحقیقاتی شماره ۷۵۰۴۰۲/۶/۷ و همچنین از زحمات آقایان مهندس محمد مهدی غفاری و مهندس ایرج اشرفی تمامی تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Anjum, M. F., Mafura, M., Slickers, P., Ballmer, K., Kuhnert, P., Woodward, M. J. et. al. (2007) Pathotyping *Escherichia coli* by Using Miniaturized DNA Microarrays. Appl. Environ. Microbiol. 73: 5692-5697.
2. Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschape, H. et. al. (1994) Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. Infect. Immunol. 62: 606-614.
3. Bruant, G., Maynard, C., Bekal, S., Gaucher, I., Masson, L., Brousseau, R. et. al. (2006) Development

اسهال گوساله‌ها دارای تعیین‌کننده‌های حدت اعضاء پاتوتیپ UPEC بودند و این پاتوتیپ جزء بیماریزاهای خارج روده‌ای تقسیم بندی می‌شود.

در مطالعه حاضر تعداد زیادی از ژن‌های حدت مشترک بین پاتوتیپ‌های مختلف در نمونه‌های متفاوت با پاتوتیپ مشخص، مشاهده شده و این حالت در تمامی مطالعات قبلی که به منظور تعیین پاتوتیپ و ژنوتیپ سویه‌های مختلف اشریشیا کلی انجام گرفته مشاهده شده است (۱،۳،۱۶،۲۳).

مطابق مطالعات انجام گرفته بیشترین پاتوتیپ‌هایی که در دستگاه گوارش حیوانات ردیابی شده اند شامل EPEC, EHEC و ETEC بوده (۱۸،۱۹،۲۷،۲۸) و در مطالعه حاضر علاوه بر این پاتوتیپ‌ها، سویه‌هایی از پاتوتیپ UPEC نیز مشاهده می‌شوند.

پاتوتیپ ETEC رایج‌ترین پاتوتیپی است که باعث ایجاد اسهال در چند روز اول تولد گوساله‌ها شده و این اجرام بیماریزایی خود را از طریق اتصال به یاخته‌های مخاطی دستگاه گوارش بواسطه آدزین‌های F18، F41 و F4، F5، F6، F17، و همچنین تولید سموم روده‌ای حساس به حرارت (LT) و مقاوم به حرارت (ST) که توسط پلاسمیدها رمزدهی می‌شوند، انجام می‌دهند (۱۹).

در برخی مراجع برای اعضاء پاتوتیپ‌های EPEC و EHEC مکانیسم بیماریزایی و عوامل حدت مشابهی را در نظر گرفته اند به استثناء این مهم که اعضاء EHEC توانایی تولید سمی مشابه سم شینگلا دیسانتریه (*Shiga like toxin*) را داشته، اما در برخی منابع دیگر مضاف بر این اختلاف، بیماریزایی آنها را بدلیل آدزین‌های متفاوت، فاکتورهای ترشحی و مکانیسم‌های تنظیمی این عوامل حدت با یکدیگر متفاوت می‌دانند (۲۸). سویه‌های EPEC در گوساله‌ها حضور داشته و توانایی ایجاد بیماری در انسان و حیوانات را داشته و اینگونه بیان می‌شود که حیوانات و بخصوص نشخوارکنندگان حاملین خاموش سویه‌های EHEC بوده و پس از ایجاد عفونت در انسان، آنها سم مشابه سم شینگلا را تولید نموده و علائم بالینی متفاوتی را در انسان ایجاد می‌نمایند و این امر را دلیل تفاوت بیماریزایی سویه‌های EPEC و EHEC در حیوانات و انسان می‌دانند (۲۰،۲۸).

اعضاء پاتوتیپ APEC برخلاف پاتوتیپ‌های روده‌ای *E. coli* عمدتاً ایجادکننده عفونت‌های تنفسی و سیستمیک در طیور بوده و بیماریزایی این سویه‌ها را بر پایه حضور و بیان عوامل حدتی از قبیل پادگن‌های سطحی CS31A و فیمریه‌های P, F1, AC/I, Afa, F17 و اینتیمین، کلی سین V، هماگلوترینین حساس به حرارت (tsh)، سیستم‌های دخیل در اخذ آهن از محیط (fyu, irp, iuc, iutA)، عامل افزایش مقاومت سرمی (iss)، سم خود انتقالی ایجادکننده واکوئل (vat) و سم مقاوم به حرارت تهاجمی به روده (ast) می‌دانند (۸،۱۴،۲۹،۳۳) و در مطالعه حاضر جدایه‌هایی که دارای عوامل خاص این پاتوتیپ بوده بعنوان APEC و بقیه



شماره نمونه	سروتیپ	ژن های حدت اختصاصی ردیابی شده مربوط به پاتوتیپ های مختلف (اسپهال گوساله ها)	پاتوتیپ
350	O111	<i>stx1A, stx1B, wbdI, lpfA(EHEC), ehxA, efa1, malX, set, ureD, eae, eae(gamma), espA-1, espB-2, tir-3, ler, escJ, nleA(EHEC), nleb, nlec, nleG, paa,</i>	EHEC
337	O111	<i>fyuA, irp1, irp2, lpfA(EHEC), ehxA, cif, efa1, malX, set, ureD, eae, eae(beta), espA-1, espB-3, tir-1, ler, nleA(EHEC), nleb, nleC, nleD, nleF, nleG, paa</i>	EHEC
35	O45	<i>stx1A, stx1B, lpfA(EHEC), ehxA, cif, efa1, malX, set, ureD, eae(gamma), espA-1, espB-2, tir-3, ler, escJ, nleA(EHEC), nleb, nleC, nleG, paa,</i>	EHEC
231	O45	<i>kpsM-II, wzy(O45K1), csnA, malX, tia, pixA,</i>	UPEC
239	O126	<i>All positive genes are for common virulence factors</i>	نامشخص
247	O20	<i>leoA, iroN, lpfA, papA(12), papC, capU, tia, tibC, shf, virK, papGII, papGII,</i>	EPEC
164	O20	<i>lpfA</i>	نامشخص
O157-A	O157	<i>stx1A, stx1B, stx2A, stx2B-1, chuA, fepC, rfbE, lpfA(O157), wzy(O157:H7), ehxA, efa1, espP, etpD, katP, ECs1282, L7095, rtx, set, ureD, eae(gamma2), espA-2, espB-1, ler</i>	EHEC
19	O157	<i>stx1A, stx1B, chuA, fepC, rfbE, lpfA(O157), ehxA, efa1, espP, etpD, katP, tibC, rtx, set, ureD, eae(gamma2), paa, nleA(EHEC), nleb(O157), nlec(O157), nleD, nleF, nleG</i>	EHEC
387	نامشخص	<i>fyuA, irp1, irp2, lpfA, ehxA, cif, efa1, set, eae(beta), espA-1, tir-1, ler, nleA, nleC, nleG</i>	EPEC
244	نامشخص	<i>leoA, iroN, fedA, lpfA, papA(12), papC, tia, papGII,</i>	UPEC(?)
799	نامشخص	<i>chuA, kpsM-II</i>	UPEC(?)
790	نامشخص	<i>All positive genes are for common virulence factors</i>	نامشخص
756	نامشخص	<i>stx1A, stx1B, lpfA(EHEC), lpfA(O113), set, ureD, eae, eae(gamma), espA-1, ler, nleb</i>	EHEC (O113)
745	نامشخص	<i>LT-IIaA, cdtB-3, cnf2, hlyA, fimA, fimH, traT, artJ</i>	ETEC

جدول ۲- ژن های حدت اختصاصی ردیابی شده در نمونه های کلی باسیلوزیس طیور در مورد تمامی نمونه ها فقط ژن های حدت اختصاصی پاتوتیپ های مختلف که ردیابی شده اند ذکر گردیده و از ذکر ژن های حدت ردیابی شده و مشترک بین تمامی پاتوتیپ ها صرف نظر شده است.

شماره نمونه	سروتیپ	ژن های حدت اختصاصی ردیابی شده مربوط به پاتوتیپ های مختلف (اسپهال گوساله ها)	پاتوتیپ
6_1	نامشخص	<i>iutA(2), fimA, fimH, lpfA, papC, hlyE, hra1, ibeB, iss, malX, ompA, ompT, traT, mviM, mviN</i>	ExPEC
26	نامشخص	<i>chuA, fepC, fyuA, lpfA, tsh, vat, ibeA, malX,</i>	APEC/ExPEC
14	نامشخص	<i>chuA, fyuA, irp1, irp2, lpfA, tsh, vat, ibeA, malX,</i>	APEC/ExPEC
11	O2	<i>iroN, iroN(2), lpfA, hlyE, hra1</i>	APEC/ExPEC
i	O2	<i>iroN, lpfA, hlyE, tsh,</i>	APEC/ExPEC
B	O2	<i>chuA, fepC, iroN, fyuA, irp2, lpfA, papC, tsh, malX, papGII,</i>	APEC/ExPEC
P	O2	<i>iroN, irp2, lpfA, tsh,</i>	APEC/ExPEC
512	O2	<i>iroN, lpfA, csgA, csgE, ompA, TraT, mviN, astA</i>	ExPEC
514	O2	<i>All positive genes are for common virulence factors</i>	نامشخص
J	O78	<i>iroN, iroN(2), lpfA, tsh</i>	APEC/ExPEC
M	O78	<i>iroN, fl65(1)A, lpfA, papA(11), papC, tsh, papGII,</i>	APEC/ExPEC
Madani-1	O78	<i>iroN, lpfA, tsh, spaS, hlyE</i>	APEC/ExPEC
Madani-2	O78	<i>iroN, lpfA, tsh, spaS</i>	APEC/ExPEC
500	O78	<i>iroN, iut, kpsM II</i>	ExPEC
501	O78	<i>iroN, lpfA</i>	ExPEC
504	O78	<i>iroN, lpfA, hlyE, hra1</i>	ExPEC

دستگاه گوارش و همچنین حضور و پیوستگی برخی ژن ها با یکدیگر در پلاسمیدها و کروموزوم باکتری باشد (۱۵، ۱۷، ۲۵) و در مطالعه حاضر این امر به نوعی مشاهده می شود، زیرا برخی سویه های جدا شده از موارد

دریافتند که برخی تعیین کننده های حدت موجود در سویه های بیماریزای روده ای در جدایه های بیماریزای خارج روده ای نیز حضور دارند که این امر می تواند بدلیل طبیعت همزیست بودن این اجرام در محیط



23. Palaniappan, R. U. M., Zhang, Y., Chiu, D., Torres, A., Debroy, C., Whittman, T. S. et. al. (2006) Differentiation of *Escherichia coli* Pathotypes by Oligonucleotide Spotted Array. *J. Clin. Microbiol.* 44: 1495-1501.
24. Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., carniel, E., Heesemann, J. (1998) Prevalence of the high pathogenicity island of Yersinia species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect. Immunol.* 66: 480-485.
25. Selander, R. K., Korhonen, T. K., Vaisanen-Rhen, R., Williams, P. H., Pattison, P. E., Caugant, D. A. (1986) Genetic relationships and clonal structure of strains of *Escherichia coli* causing neonatal septicemia and meningitis. *Infect. Immun.* 52: 213-222.
26. Sharpe, V. K. (2002) Detection and quantitation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, O111 and O26 in beef and bovine feces by real-time polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* 65: 1371-1380.
27. Smith, J. L., Fratamico, P. M., Gunther, N. W. (2007) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog. Dis.* 4: 134-150.
28. Spears, K. J., Roe, A. J., Gally, D. L. (2006) A comparison of enteropathogenic *Escherichia coli* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. *FEMS. Microbiol Lett.* 255: 187-202.
29. Stordeur, P., Marlier, D., Blanco, J., Oswald, E., Biet, F., Dho-Moulin, M. et. al. (2002) Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesion genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. *Vet. Microbiol.* 84: 231-241.
30. Van Ijperen, C., Kuhnert, P., Frey, J., Cleweley, J. P. (2002) Virulence typing of *Escherichia coli* using microarrays. *Mol. Cell. Probes.* 16: 371-378.
31. Wang, H. Y., Malek, R. L., Kwitek, A. E., Greene, A. S., Luu, T. V., Behbahani, B. et. al. (2003) Assessing unmodified 70-mer oligonucleotide probe performance on glass-slide microarray. *Genome. Biol.* 4: 5.
32. Wing, G., Clark, C. G., Rodgers, F.G. (2002) Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3613-3619.
33. Won, G., Moon, B., Oh, I., Matsuda, K., Chaudhari, A. A., Hur, J. et. al. (2009) Profiles of Virulence-associated Genes of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from chickens with colibacillosis. *JPSA.* 46:260-263.
34. Wu, C. F., Valdes, J. J., Bentley, W. E., Sekowski, J. W. (2003) DNA microarray for discrimination between pathogenic O157:H7 EDL933 and non-pathogenic *Escherichia coli* strains. *Biosens. Bioelectron.* 19: 1-8.
35. Wu, L., Thompson, D. K., Li, G., Hurt, R. A., Tiedje, J. M., Zhou, J. (2001) Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5780-5790.



- and validation of an oligonucleotide microarray for detection of multiple virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3780-3784.
4. Call, D. R., Bakko, M. K., Krug, M. J., Roberts, M. C. (2003) Identifying antimicrobial resistance genes with DNA microarrays. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47: 3290-3295.
 5. Chizhikov, V., Rasooly, A., Chumakov, K., Lery, D. D. (2001) Microarray analysis of microbial virulence factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3258-3263.
 6. Cho, J. C., Tiedje, J. M. (2001) Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3677-3682.
 7. Clark, C. G., Johnson, S. T., Easy, R. H., Campbell, J. L., Rodgers, F. G. (2002) PCR for detection of cdt-II and the relative frequencies of cytolethal distending toxin variant-producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2671-2674.
 8. Dho-Moulin, M., Fairbrother, J. M. (1999) Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* 30: 299-316.
 9. Dobrindt, U., Agerer, F., Michaelis, K., Janka, A., Buchrieser, C., Samuelson, M. et. al. (2003) Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolated by use of DNA arrays. *J. Bacteriol.* 185: 1831-1840.
 10. Ewers, C., Janbsen, T., Wieler, L. H. (2003) Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Berli Munch Tierarztl Wochenschr.* 116:381-395.
 11. Finlay, B. B., Falkow, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 136-169.
 12. Fukushima, M., Kakinuma, K., Hayashi, H., Nagi, H., Ito, K., Kawaguchi, R. (2003) Detection and identification of Mycobacterium species isolates by DNA microarray. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2605-2615.
 13. Hacker, J., Blum, G., Mholdorfer, I., Tschape, H. (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* 23: 1089-1097.
 14. Jeffrey, J. S., Nolan, L. K., Tonooka, K. H., Wolfe, S., Giddings, C. W., Horne, S. M. et. al. (2002) Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. *Avian Dis.* 46:48-52.
 15. Johnson, J. R., Oswald, E., OBryan, T. T., Kuskowski, M. A., Spanjaard, L. (2002) Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates with neonatal bacterial meningitis in the Netherlands. *J. Infect. Dis.* 185: 774-784.
 16. Korczak, B., frey, J., Schrenzel, J., Pluschke, G., Pfister, R., Ehricht, R. et. al. (2005) Use of diagnostic microarrays for determination of virulence gene patterns of *Escherichia coli* K1, a major cause of neonatal meningitis. *J. Clin. Microbiol.* 43: 1024-1031.
 17. Korhonen, T. K., Valtonen, M. V., Parkkinen, J., Vaisanen-Rhen, V., Finne, J., Orskov, F. et. al. (1985) Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infect. Immun.* 48: 486-491.
 18. Mainil, J. G., Jacquemin, E., Heralut, F., Oswald, E. (1997) Presence of *pap-*, *sfa-*, and *afa-* related sequences in necrotogenic *Escherichia coli* isolates from cattle: evidence for new variants of the AFA family. *Can.J.Vet.Res.* 61: 193-199.
 19. Nagy, B., Fekete, P. Z. (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *IJMM.* 295: 443-454.
 20. Nataro, J. P., Kaper, J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142-201.
 21. Osek, J. (2003) Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin markers in *E. coli* isolated from pigs with diarrhea. *Vet. Microbiol.* 91: 65-72.
 22. Ott, M. (1993) Dynamics of bacterial genome-deletions and integrations as mechanisms of bacterial virulence modulation. *Zbl. Bakteriologie. Int. J. Med. Microbiol.* 278: 457-468.

