

## Genes de Virulencia y Grupo Filogenético en Aislados de Escherichia Coli Patogénica Aviar

### Virulence Genes and Phylogenetic Group in Isolates of Escherichia Coli Pathogenic Avian

Víctor Hugo Márquez López<sup>1</sup>,  
Iliana Quiroz Serrano<sup>1</sup>,  
Patrocinio del Pilar Miranda Delgado<sup>1</sup>,  
Luz Elena Vidales Rodríguez<sup>1</sup>,  
Sergio Hugo Sánchez Rodríguez<sup>2</sup>,  
María Argelia López Luna<sup>3</sup>,  
Armando Flores de la Torre<sup>3</sup>  
and Rosa María Ramírez Santoyo<sup>1\*</sup>

#### Resumen

*Escherichia coli* patogénica aviar (APEC) comparte atributos de virulencia con cepas de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales en humanos y se considera que pudiera ocasionar una zoonosis por lo cual el objetivo de este trabajo fue determinar en un grupo de aislados de APEC la prevalencia de doce genes asociados a la virulencia así como identificar los grupos filogenéticos a los que pertenecen. De acuerdo a los resultados se encontró que uno de los aislados alberga el 91.6% de los genes de virulencia analizados y que la mayoría de estos tiene entre 7 y 8 de estos genes. *feoB* e *iss* tuvieron la mayor prevalencia con un 95.6% y los genes relacionados con la adquisición de hierro estuvieron presentes en más del 60% de APEC, mientras que los de la invasina *ibeA* y de la toxina *vat* fueron los que se detectaron con la menor prevalencia. Los resultados mostraron la gran diversidad genética de los aislados APEC y sugieren que los sistemas bacterianos de adquisición de hierro, así como los relacionados con la resistencia a los mecanismos de defensa del hospedero son factores de virulencia fundamentales en estas bacterias, sin embargo, la presencia del resto de genes de virulencia es importante, ya que proporciona información valiosa para el desarrollo de vacunas contra la colibacilosis aviar. Se determinó que un alto porcentaje de APEC pertenece al grupo filogenético B1 grupo del que derivan principalmente cepas de *E. coli* comensales y patogénicas intestinales, este resultado fortalece hallazgos sobre la evolución de patógenos a través de la adquisición de genes de virulencia mediante la vía horizontal.

**Palabras Claves:** Colibacilosis; Genes de virulencia; Origen filogenético

- 1 Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas, México
- 2 Laboratorio de Biología Celular y Neurobiología, Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas, México
- 3 Laboratorio de Toxicología y Farmacia, Unidad Académica de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Zacatecas, México

**\*Correspondencia:**

Rosa María Ramírez-Santoyo

✉ rMrs20@hotmail.com

#### Abstract

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) shares virulence attributes with strains of *E. coli* that cause extraintestinal infections in humans and it is considered that it could cause a zoonosis; therefore, the objective of this work was to determine prevalence in a group of APEC isolates of twelve genes associated with virulence as well as identifying the phylogenetic groups to which they belong. According to the results it was found that one of the isolates harbors 91.6% of the virulence genes analyzed and that most of these have between 7 and 8 of these genes. *feoB* and *iss* had the highest prevalence with 95.6% and the genes related to iron acquisition were present in more than 60% of APEC, while those of the *ibeA* invasin and *vat* toxin were those that were detected with the lowest prevalence. The results showed the great genetic diversity of APEC isolates and suggest that bacterial systems of iron acquisition, as well as those related to resistance to host

are fundamental virulence factors in these bacteria, however, the presence of the rest of the virulence genes is important, since it provides valuable information for the development of vaccines against avian colibacillosis. It was determined that a high percentage of APEC belongs to the phylogenetic group B1 group from which mainly commensal and pathogenic *E. coli* strains derive, this result strengthens findings on the evolution of pathogens through the acquisition of virulence genes through the horizontal route.

**Keywords:** Colibacillosis; Virulence genes; Phylogenetic origin

**Fecha de recepción:** Dec 10, 2017, **Fecha de aceptación:** Jan 22, 2018, **Fecha de publicación:**

Jan 27, 2018

## Introducción

*Escherichia coli* patogénica aviar (APEC) ocasiona una enfermedad respiratoria en aves que generalmente se complica en septicemia, estas cepas comparten factores de virulencia con *E. coli* causante de enfermedades extraintestinales en humanos y se considera que puede originar una zoonosis [1], bajo esta premisa es importante de analizar estos atributos de patogenicidad.

La capacidad de APEC para causar enfermedad depende de numerosos factores asociados a la patogenicidad como son: serogrupos, adhesinas, sistemas de adquisición de hierro, factores para evadir las defensas del hospedero, toxinas, invasinas entre otros [2]. Entre las adhesinas destacan las fimbrias tipo 1 y P [2,3], así como curli y Tsh que se han relacionado con la colonización del tracto respiratorio [4]. A diferencia de *E. coli* de biota intestinal, APEC expresa enterobactinas, aerobactinas y yersiniabactinas para la captación y transporte del hierro [5,6]. Adicionalmente, esta bacteria sintetiza proteínas de membrana externa que le permiten resistir al sistema del complemento, entre ellas Iss, Trt y OmpA1 así como aquellas que contribuyen en la formación de biopelículas [7].

Por otra parte, los plásmidos son importantes en la patogenicidad de APEC, entre ellos el pColV que porta genes que codifican para la virulencia y tiene algunos operones con función desconocida así como una gran variedad de elementos móviles [8]. Los genes de virulencia *iucA*, *tsh*, *iss*, *iroN* y *sitA*, *hlyF*, *ompT* y el operon *estABC* han sido detectados en diversos plásmidos incluyendo aquellos no colicinogénicos [6,9,10].

El origen filogenético de *E. coli* se determina en función de la combinación de tres marcadores específicos, los genes *yjaA* y *chuA*, además de TspE.4C2 los cuales tienen una relación dicotómica que permite distinguir cuatro grupos filogenéticos designados como A, B1, B2 y D [11], previamente se ha reportado que los aislados causantes de infecciones extraintestinales (ExPEC), incluyendo las infecciones urinarias y la sepsis, derivan principalmente del grupo B2 y en menor proporción del grupo D, mientras que *E. coli* comensal y patogénica intestinal (IPEC) derivan de los grupos A y B1 [12,13].

El objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de genes de virulencia en aislados APEC, así como determinar el grupo filogenético al que pertenecen.

## Material y Metodos

**Aislados bacterianos:** Se utilizaron 23 aislados APEC obtenidos a partir de órganos parenquimatosos de aves que cursan un cuadro de colisepticemia y que previamente fueron identificados por pruebas bioquímicas.

**Extracción de ADN cromosómico:** Se realizó de acuerdo a lo descrito por Sambrook y Russell (2001) [14], brevemente, cada aislado se sembró en caldo LB y se incubó 18 h a 37°C en agitación por 18h. Pasado este tiempo 1.5 ml del cultivo se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min, el paquete celular se recuperó y se agregaron 300 µl de buffer de lisis (EDTA 0.05 M, NaCl, 0.1 M pH=7.5), se resuspendió y se incubó en baño maría a 80°C por 5 min, luego se adicionaron 20 µl de SDS al 1% y se incubó a 37°C por 30 min. Se agregaron 100 µl de acetato de potasio 5 M y se centrifugó a 12,000 rpm por 3 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo y se agregaron 300 µl de isopropanol frío, se centrifugó a 12,000 rpm por 3 min, luego se eliminó el sobrenadante y el botón se lavó con 300 µl de etanol al 70%. Se centrifugó 12,000 rpm por 3 min y el ADN se dejó secar por 15 min y se resuspendió en agua destilada y se guardó a -20°C.

**Extracción de ADN plasmídico:** Se hizo por el método de lisis alcalina. Cada aislado se inoculó en 5 ml en LB y se incubó por 18 hrs en agitación constante a 37°C. Se centrifugó a 12,000 rpm por 8 min y al paquete celular se agregaron 200 µl de GTE (50 mM Glucosa, Tris-Cl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM), se mezcló y se adicionaron 400 µl de NaOH 0.2 M/SDS 1%, nuevamente se mezcló por inversión suavemente cinco veces y se incubó durante 10 min. Posteriormente se agregaron 300 µl de acetato de potasio 5M, se agitó fuertemente y se incubó en hielo por 20 min. Se centrifugó a 12,000 rpm por 20 min y la fase acuosa se transfirió a un tubo en donde se adicionaron dos volúmenes de isopropanol para luego incubar 45 min y centrifugar a 12,000 rpm por 15 min, luego se eliminó el sobrenadante y se dejó secar por 20 min. El ADN se resuspendió en agua destilada y se guardó a -20°C [14].

**Detección de los genes de virulencia:** Los genes de virulencia a detectar fueron seleccionados considerando su papel en el proceso patogénico y se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos específicos. Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: para *iroN*, *sitA*, *feoB*, *irp-2*, *iss*, *ompT* y *tsh*: 94°C por 4 min, seguida de 30 ciclos de, 94°C a 1 min, 59°C a 1 min y 72°C a 2 min. Para *ibeA* y *vat* fueron: 94°C por 4 min, 30 ciclos de 94°C a 30 seg, 55°C a 30 seg y 72°C a 1 min. Mientras que para *csgA* y *cvaC*: 95°C por 2 min, 30 ciclos de 94°C a 1:30 min, 54°C a 1 min y 72°C a 1.5 min y para el gen *fimH* fueron: 95°C por 4 min, 30 ciclos de, 95°C a 30s, 57°C a 30s y 72°C a 2 min, en todos los casos con una extensión final de 72°C a 10 min.

**Identificación de grupos filogenéticos:** Se utilizó el método descrito por Clermont y col (2000)<sup>11</sup> que se basa en la presencia o ausencia de la combinación de los genes *chuA*, *yjaA* y del fragmento de ADN TspE4C2, los cuales se detectaron por PCR, utilizando oligonucleótidos y condiciones de amplificación descritas por el mismo autor.

## Resultados

**Los genes de virulencia son codificados mayormente en plásmidos:** De los doce genes de virulencia analizados, el 75% fueron detectados en ADN plasmídico y el resto en ADN cromosómico. Los primeros corresponden a *ompT*, *iss*, *tsh*, *vat*, *iroN*, *sitA*, *feoB*, *csgA* y *cvaC* mientras que *fimH*, *ibeA* e *irp2* se detectaron en el cromosoma.

**Frecuencia de genes de virulencia en aislados APEC:** Los genes *irp-2*, *iroN*, *sitA* y *feoB* relacionados con los sistemas de captación de hierro se amplificaron en más del 60% de los aislados, destacando *feoB* con una frecuencia del 95.6%, en la misma proporción se detectó *iss* relacionado con mecanismos de resistencia al suero. Los genes de las adhesinas fimbria 1 y curli se detectaron en un 73%, y *tsh* en un 39%, por su parte la frecuencia de *ompT* que codifica para la proteasa que actúa contra péptidos antimicrobianos fue del 26%. En menor frecuencia se encontraron a *vat* e *ibeA*, el primero fue positivo en el 13% de los aislados, mientras que *ibeA* relacionado con la formación de biopelículas estuvo presente en el 8%. Finalmente, *cvaC* gen indicativo de presencia de plásmidos ColV se detectó en un 91%.

**Diversidad genética en los aislados APEC:** Los genes de virulencia y número de estos varió dependiendo del aislado APEC, en YA15 se determinaron once de los doce genes de estudio, en YA1 diez genes, mientras que YA16 y YA17 presentaron nueve de ellos. El 30% de los aislados portaron ocho genes de virulencia, y 34.8% de los aislados APEC contienen siete genes. Dos aislados tuvieron seis genes de virulencia y un aislado presentó cinco, por último el aislado RS10 presentó solamente dos genes de virulencia correspondiente al 4.3%. Destaca el hecho de que el 64.8% de los aislados presentó entre 7 y 8 de los genes de virulencia analizados (Tabla 1).

**Grupos filogenético en los aislados APEC:** El 8.6% de los aislados son del grupo filogenético A el 34.7% pertenecen al B1, mientras que al grupo B2 correspondió un 34.7% y un 21.7% para el D. El rango de genes de virulencia por grupo filogenético se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1 Diversidad genética de 23 aislados APEC en relación a atributos de virulencia.

Cepa	lrp2	iroN	sitA	feoB	fimH	tsh	csgA	ibeA	iss	vat	cvaC	ompT	No.genos
YA15	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	11
YA1	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	10
YA16	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	9
YA17	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	9
YA6	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	8
YA8	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	8
YA10	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	8
YA11	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	8
YA13	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	8
RS14	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	8
RS17	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	8
YA4	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	7
YA5	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	7
YA9	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	7
YA12	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	7
YA18	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	7
YA21	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	7
YA23	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	7
RS16	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	7
YA2	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	6
RS11	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	6
YA14	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	5
RS10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	2

**Tabla 2** Grupo filogenético y genes de virulencia en 23 aislados APEC.

Grupo filogenético	Número de aislados	Rango de Genes de virulencia	Promedio de genes de virulencia
A	2	7 a 8	7.50%
B1	8	6 a 8	7.00%
B2	8	7 a 11	8.00%
D	5	2 a 8	6.25%

## Discusión

La mayoría de los genes de virulencia se detectaron con una frecuencia superior al 50% y se mostró que los aislados tienen una alta variabilidad genética respecto a estos determinantes. *fimH* se detectó con una frecuencia del 73%, coincidiendo con el 76.6% observado por Ghanbarpour et al. [15]. La frecuencia de la fimbria curli, fue de un 73%, mientras que Maurer et al. [16] lo encontraron en la totalidad de las cepas de estudio y Knobl et al. [17] reportaron una frecuencia del 26%. *tsh* ha mostrado capacidad de adherencia a células Caco-2 [18] y la prevalencia de este gen respectivo, ha sido reportado entre 10% y 90% [2,17,19,20]. En este trabajo se detectó en 39% coincidiendo más estrechamente con el 39.5% reportado por Delicato et al. [21]; la discrepancia en la prevalencias reportadas muestran la heterogeneidad de los aislados APEC.

Cabe destacar la alta frecuencia encontrada para los genes relacionados a la captación de hierro, en particular de *feoB*, este gen que forma parte del sistema Feo el cual tiene como función transportar hierro ferroso y ha sido asociada a la virulencia tanto en *E. coli* como en *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila* y *Campylobacter jejuni* [22]. La captación de hierro parecen ser uno de los principales factores de virulencia en cepas APEC, Jeong et al. [23] atribuyen la presencia en APEC de redundantes sistemas de captación de hierro al hecho de que estos pudieran funcionar en los diferentes nichos en el hospedero.

En relación con *iss* cuya función es mediar la resistencia bacteriana al complemento sérico, Pfaff-McDonough et al. [24] destacaron su importancia en *E. coli* aislada de aves enfermas (77%), en comparación con el 19% encontrado en aislados de aves sanas. En este trabajo la frecuencia de *iss* fue del 95%, siendo acorde con lo reportado por Janßen et al. [25] con un 94%, y con el 100% según Kwon et al. [19]. Esta alta frecuencia revela la importancia de función de *iss* que permite a *E. coli* evadir las defensas del hospedero, multiplicarse y diseminarse favoreciendo así el desarrollo de la enfermedad.

En este trabajo *ibeA* fue detectado en un 8% de los aislados, mientras que Rodríguez-Siek et al. [2] y Zhao et al. [26] reportaron una frecuencia de 14.7% y 17% respectivamente. La participación de *ibeA* en APEC, está relacionada con la formación de biopelículas in vitro y con la capacidad de invasión en cepas APEC, aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual *ibeA* contribuye al desarrollo de la colibacilosis.

El gen *vat* en APEC induce la formación de vacuolas intracelulares con efectos citotóxicos similares a los causados por la toxina VacA de *Helicobacter pylori*. La frecuencia de *vat* ha sido reportada de 10%, 34% y 95% [19,20,23]; en este trabajo se detectó en un 13% de los aislados. *vat* se localiza en una PAI y al respecto se ha propuesto a la adquisición de PAIs como el principal mecanismo de la evolución de patógenos, bajo este esquema se podría explicar la diversidad genética de APEC.

La patogenicidad en APEC es multigenético, el número de genes implicados y las combinaciones entre estos es lo que probablemente aumente la virulencia, por lo cual es importante analizar dichas combinaciones y definir así los patotipos moleculares.

Elementos genéticos móviles tales como PAIs y algunos plásmidos contribuyen a la virulencia bacteriana debido a que albergan genes específicos. Aquí se detectó el plásmido ColV en el 91% de los aislados, en otros estudios ha sido reportado del 53 al 67% [2,26,27]. La detección combinada de los genes *tsh*, *iss*, *iroN* y *cvaC* sugiere la presencia de plásmidos ColV; en este estudio la combinación *iss*, *iroN* y *cvaC* fue del 69.5%, mientras que la de *iss*, *tsh* y *cvaC* disminuyó a un 34.7%, esto pudiera explicarse en función de que *iss* y *iroN* junto con otros genes se localizan en la región conservada en los pColV de APEC, en tanto que *tsh* se localiza en la región variable y está flanqueada por elementos de IS1, lo que sugiere su alta movilidad. Los aislados YA21 y YA2 no presentaron *cvaC*, pero si las combinaciones *iss-iroN* o *tsh-iss*, amplificados a partir de ADN plasmídico, sugiriendo la presencia de plásmidos de virulencia no ColV. La importancia de la presencia de genes de virulencia en plásmidos reside en el desarrollo de nuevas cepas debido a la transferencia de elementos genéticos móviles.

En base a la clasificación filogenética de *E. coli*, era de esperar que la mayoría de los aislados APEC pertenecieran a los grupos filogenéticos B2 y D, sin embargo destaca que el 34.7% de los aislados derivan del grupo B1, en la misma proporción que para el grupo B2. Además el número de genes de virulencia fue similar en ambos grupos con un promedio de siete genes, lo cual no es acorde con lo descrito para el grupo B1, que alberga principalmente a cepas comensales. En este sentido Zhao et al. [26], reportó que el 40% de los aislados APEC que analizó pertenecen al grupo A, el cual también ha sido clasificado como de cepas comensales e IPEC; de igual forma Jeong et al. [23] encontró altos porcentajes de aislados APEC dentro de los grupos A y B. Bajo este esquema se asume que la clasificación de *E. coli* en grupos filogenéticos per se, no permite diferenciar las cepas comensales de las cepas ExPEC y sugiere que el origen filogenético de los aislados APEC es diverso.

## Referencias

- 1 Dziva F, Stevens MP (2008) Colibacillosis in poultry: Unraveling the molecular basis of virulence of avian pathogenic Escherichia coli in their natural hosts. Avian Pathol 37: 355-366.
- 2 Rodríguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Fakhr MK, Nolan LK (2005) Comparison of Escherichia coli isolates implicated

in human urinary tract infection and avian colibacillosis. Microbiol 151: 2097-2110.

- 3 McPeake SJW, Smyth JA, Ball HJ (2005) Characterisation of avian pathogenic Escherichia coli (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. Vet Microbiol 110: 245-253.

- 4 Dozois CM, Dho-Moulin M, Brée A, Fairbrother JM, Desautels C, et al. (2000) Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the tsh genetic region. *Infect Immun* 68: 4145-4154.
- 5 Silveira WD, Ferreira A, Brocchi M, Hollanda LM, Castro AF, et al. (2002) Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet Microbiol* 85: 47-53.
- 6 Johnson TJ, Siek KE, Johnson SJ, Nolan LK (2006) DNA Sequence of a ColV Plasmid and Prevalence of Selected Plasmid-Encoded Virulence Genes among Avian *Escherichia coli* Strains. *J Bacteriol* 188: 745-758.
- 7 Wang S, Niu C, Shi Z, Xia Y, Yaqoob M, et al. (2011) Effects of *ibeA* deletion on virulence and biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 79: 279-287.
- 8 Johnson TJ, Siek KE, Johnson SJ, Nolan L (2005) DNA sequence and comparative genomics of pAPEC-O2-R, an avian pathogenic *Escherichia coli* transmissible R plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 4681-4688.
- 9 Mellata M, Touchman WF, Curtiss III R (2009) Full Sequence and comparative analysis of the plasmid pAPEC-1 of avian pathogenic *E. coli* x7122 (O78:K80:H9). *Plos One* 4: e4232.
- 10 Tivendale AK, Allen LJ, Browning FG (2009) Plasmid-Borne Virulence-associated genes have a conserved organization in virulent strains of avian pathogenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 47: 2513-2519.
- 11 Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied Environ Microbiol* 66: 4555-4558.
- 12 Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, et al. (1999) The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* 67: 546-553.
- 13 Toval F, Köhler CD, Vogel U, Wagenlehner F, Mellmann A, Fruth A, et al. (2014) Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. *J Clin Microbiol* 52: 407-418.
- 14 Sambrook J, Russell DW (2001) Spectrophotometry of DNA or RNA. In *molecular cloning. Laboratory Manual*. 3: 20-21.
- 15 Ghanbarpour R, Derakhshanfar A, Pourbakhsh A (2003) Determination of P (F11) and F1 fimbriae of *Escherichia coli* isolated from avian cellulitis. *Vet Arch* 73: 227-236.
- 16 Maurer JJ, Brown TP, Steffens WL, Trayer SG (1998) The occurrence of ambient temperature-regulated adhesions, curli and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases* 42: 106-118.
- 17 Knöbl T, Moreno AM, Paixao R, Tardelli T, Midolli M, et al. (2012) Prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) clone harboring *sfa* gene in Brazil. *Scientific World Journal* 2012.
- 18 Frömmel U, Lehmann W, Rodiger S, Bohm A, Nitschke J, et al. (2013) Adhesion of human and animal *Escherichia coli* strains in association with their virulence-associated genes and phylogenetic origins. *Appl Environ Microbiol* 79: 5814-5829.
- 19 Kwon SG, Cha SY, Choi EJ, Kim B, Song E, et al. (2008) Epidemiological prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* differentiated by multiplex pcr from commercial chickens and hatchery in Korea. *J Bacteriol Virol* 38: 179-188.
- 20 Qabajah M, Ashhab Y (2011) Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) in Palestine: Characterization of virulence factors and antibiotic resistance profile. *biotechnology, Palestine polytechnic university hebron*.
- 21 Delicato ER, de Brito BG, Caziri LCJ, Vidotto MC (2003) Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet Microbiol* 94: 97-103.
- 22 Lau C, Ishida H, Liu Z, Vogel HJ (2013) Solution structure of *Escherichia coli* FeoA and its potential role in bacterial ferrous iron transport. *J Bacteriol* 195: 46-55.
- 23 Jeong YW, Kim TE, Kim JH, Kwon HJ (2012) Pathotyping avian pathogenic *Escherichia coli* strains in Korea. *J Vet Science* 13: 145-152.
- 24 Pfaff-McDonough SJ, Horne SM, Giddings CW, Ebert JO, Doertkott C, et al. (2000) Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Diseases* 44: 23-33.
- 25 Janben T, Philipp HC, Voss M, Preisinger R, Wieler L (2003) Multiplex PCR is the first technique to allow the specific and sensitive detection of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Lohmann Information* 28: 1-5.
- 26 Zhao L, Gao S, Huan H, Xu X, Zhu X, 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: 1634-1644.
- 27 Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doertkott C, Johnson TJ, Nolan LK (2004) Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res* 36: 241-256.