بررسی شیوع مهمترین سروگروپ‌های اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک و فیمبریه F۵ در گوساله‌های اسهالی زیر ۵ روز در استان‌های البرز و قزوین

عادل قره‌باغی[۱*]، صمد لطف‌اله‌زاده[۲]، محمدرضا مخبردزفولی[۳]، فرهاد موسی‌خانی[٤]، زهرا یادگاری[۵]، غلامرضا نیکبخت‌بروجنی[٦]

چکیده

اشریشیاکلی(E.Coli) فلور طبیعی مجاری گوارشی بیشتر جانوران و نیز انسان است اما برخی سویه‌های پاتوژنیک اشریشیاکلی باعث انواعی از بیماری‌های رودهای و خارج روده‌ای می‌شوند. سروتیپ اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) شایع ترین علت بروز سندروم اسهال در نوزادان حیوانات مزرعه است. مهمترین فاکتور های مرتبط با بیماری زایی در ETEC، فیمبریه است که به عنوان عامل چسبنده و انتروتوکسین های ترشحی می باشد. مهمترین فیمبریه های معمول در گوساله‌ها (K۹۹) F۵و F٤١ می باشد و بیشترین موارد K۹۹ جداشده متعلق به سروگروپ های O۸، O۹و O۱۰۱ است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان فراوانی ژن‌های مربوط به سروگروپ‌های مختلف (O۱۰۱، O۹، O۸ و...) و فیمبریه K۹۹در گوساله‌های اسهالی زیر ۵ روز است. هر نمونه بر روی محیط مک کانکی کشت و از هر پلیت، سه کلنی از باکتری به صورت جداگانه کشت داده شد، همچنین تمامی نمونه‌ها از نظر فراوانی ژن K۹۹ و در ادامه نمونه‌هایی که پس از بررسی ژن تایپ O۱۰۱ منفی بودند به ترتیب اهمیت، از نظر تایپ O۸، O۹ و O۱۱۵ با آزمایش Multiplex PCR بررسی شدند. نتایج این بررسی نشان می دهد درصد فراوانی بدست آمده از سروگروپ های O۸، O۹، O۱۰۱، O۱۱۵ و فیمبریه ی K۹۹ در گوساله‌های اسهالی به ترتیب ۱۸/۷٪، ۹/۳٪، ۵٦/۳٪، ۷/۸٪ و ۹/۳٪ و بیشترین فراوانی فیمبریه K۹۹ بین سروگروپ‌ها در سروگروپ O۱۰۱ با ۸۳/۳٪ می باشد.

واژگان کلیدی: *اشریشیاکلی، اسهال، سروگروپ، Multiplex PCR، گوساله*

تاریخ دریافت: ۹۵/٦/۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲۸

مقدمه

اسهال در گوساله‌ها مشکل بسیار جدی و مهمی بوده و یکی از علل مهم زیان اقتصادی در هر دامداری بواسطه ایجاد مرگ و میـر، تحمیل هزینه‌های درمان و کاهش رشد گوساله‌ها است. بحث در مورد علل عفونی اسهال گوساله‌ها از ۳۰ سال پیش به طور جدی مورد توجه قرار گرفته است. تا سال‌ها سالمونلا را تنها عامل مولد اسهال می‌دانستند ولی در سال ۱۹٦۷ نشان داده شد که گروه کوچکی از سوش‌های کلی باسیل، اسهال آبکی را باعث می‌شوند. این دسته از باکتری‌ها بعداً اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) نام گرفتند(٤). اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک، روتاویروس، کرناویروس، کریپتوسپوریدیوم و سالمونلا عوامل اصلی بیماری‌زا در اسهال گوساله‌ها هستند (١٤).ETEC از عوامل مهم و جهانی اسهال شدید و آبکی در نوزادان برخی گونه‌ها ازجمله گوساله‌ها و خوک‌ها است. باکتری‌های ETEC بدون اینکه تغییر شکلی در اپیتلیوم روده کوچک ایجاد کنند به آن چسبیده و با تولید توکسین‌های روده‌ای در عملکرد انتروسیت‌ها تداخل ایجاد کرده و باعث افزایش ترشح و کاهش جذب می‌شوند. بنابراین از مهمترین فاکتورهای مرتبط با بیماری‌زایی در ETEC، به عنوان عامل چسبنده و انتروتوکسین‌های ترشحی فیمبریه می‌باشد(۱۰). در اتصال ETEC به انتروسیت‌های روده کوچک گوساله‌ها، فیمبریه‌های مختلف از جمله K۹۹، F٤١ و ۹۸۷P هستند که در این بین دو فیمبریه اول پر اهمیت‌تر می‌باشد(۹). مهم‌ترین سروگروپ‌های معمول در گوساله‌ها با توجه به پاسخ‌های آنتـی‌سـرمی K۹۹ و F٤١ سروگروپ‌های O۱۰۱، O۸ و O۲۰

* ۱. دستیار تخصصی گروه بیماری‌های داخلی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران،تهران، ایران
Gharabaghi@ut.ac.ir
۲. دانشیار گروه بیماری‌های داخلی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳. استاد تمام گروه بیماری‌های داخلی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
٤. استادیار گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران
۵. دانشجوی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران،تهران، ایران
٦. استاد تمام گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران،تهران، ایران

می‌باشد و بیشترین موارد K۹۹ جدا شده متعلق به سروگروپ‌های O۸، O۹، O۲۰ و O۱۰۱ است (۱۳). هدف از این مطالعه، بررسی میزان فراوانی ژن‌های مربوط به فیمبریه K۹۹ و سروگروپ‌های مختلف (شامل O۱۰۱، O۹، O۸ و...) بر روی نمونه مدفوع‌های اخذ شده از گوساله‌های زیر ۵ روز مبتلا به اسهال به روش Multiplex PCR است.

مواد و روش کار

تعداد ٦٤ نمونه مدفوع از گوساله‌های زیر ۵ روز مبتلا به اسهال که ۳٦ نمونه مربوط به گوساله‌های نر و ۲۸ نمونه مربوط به گوساله‌های ماده بود، از دامداری‌های صنعتی دو استان البرز و قزوین اخذ شده و هر نمونه از نظر وجود اووسیت کریپتوسپوریوم تحت آزمایش شناوری قرار گرفته و پس از منفی بودن آزمایش شناوری، بر روی محیط مک کانکی کشت و سپس سه کلنی لاکتوز مثبت جهت آزمون انتخاب و پس از تایید آزمایش PCR روی محیط مک کانکی به صورت جداگانه کشت داده شد. سپس از هر کلنی رشد کرده، اشرشیاکولای به صورت جداگانه به محیط LB مایع به میزان ۵ سی‌سی در فالکون‌های ۱۵ سی‌سی منتقل و ٢٤ ساعت در انکوباتور شیکردار قرار داده شد، سپس از هر نمونه فالکون، دو سری در لوله‌ای درپیچ دار به میزان ۵۰۰ میکرولیتر ریخته و به میزان برابر از گلیسرول ۳۰٪ اضافه نموده و در دمای °c۷۰- تا زمان نیاز نگهداری شدند. از هر فالکون در حدود یک سی‌سی در لوله ۱/۵ ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ نموده و مایع رویی را دور ریخته و به پلیت باقی مانده به میزان ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه نموده و ورتکس گردید تا پلیت به صورت شیرابه در آید، سپس لوله‌ها را در دمای ۱۰۰ درجه در ظرف مخصوص برای استخراج DNA به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شدند. سپس لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شدند. به میزان ۷۰ میکرولیتر از مایع رویی که همان DNA است برداشته و در لوله استریل ریخته و تا مراحل PCRدر دمای منفی ۲۰ درجه نگهداری شدند.

برای بررسی نوع O نمونه‌ها از پرایمرهایی که به انواع مربوط به سویه ETEC است و در مطالعات شیوع بیشتری داشتند، استفاده گردید.

مخلوط PCR در حجم ۳۰ میکرولیتر و با ترکیب زیر به ازای هر نمونه آماده شد:

۳ میکرولیتر بافر ۱۰×، ۱/۵ میکرولیتر منیزیم کلراید (MgC۱۲) ۵۰ میلی‌مول، ٤ میکرولیتر مخلوط d NTP ۲ میلی‌مول، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم DNA Taq پیلمراز، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر DNA الگو، و ۱۸ میکرولیتر آب استریل

در ابتدا نمونه‌ها جهت شناسایی جنس اشریشیاکلی از پرایمر اختصاصی مربوط به اشرشیاکولای مطابق جدول ۱ مورد بررسی قرار گرفتند(۸).

جدول ۱.پرایمر اختصاصی جنس و توالی مربوط به اشریشیاکلی

اندازه محصول(bp)	پرایمر اشریشیاکلی	الگوی توالی
۸۹۷	۱٦S-F	AGAGTTTGATCC/ATGGCTCAG
	۱٦S-R	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT

سپس برای تعیین سروگروپ نمونه‌ها از پرایمرهای جدول ۲ و برای تعیین فیمبریه از پرایمر جدول ۳ استفاده گردید (۱۳ و ٦).

جدول ۲. پرایمر اختصاصی سروگروپ‌ها و الگوی توالی مربوط به آنها

اندازه محصول(bp)	پرایمر سروگروپ	الگویتوالی
۱۲۲۳	O۸(orf٤٦٩)-F	CAATCGCCAGAGGCATAA
	O۸(orf٤٦٩)-R	TCTGGCTGCCCTTGTGAG
۱۱٤۲	O۹(wzt)-F	TGGGTGTTAAAAGACATCAA
	O۹(wzt)-R	CCCAGAAATCCATGCTC
۵۰۷	O۱۰۱(wzm)-F	GTGTTACTTTCATATCGTCCAG
	O۱۰۱(wzm)-R	ATGCAATGCGGTTTCTAC
۳۲۷	O۱۱۵(wzy)-F	CGTCGTGATGTGCATTGTTT
	O۱۱۵(wzy)-R	GCAACACTAAACGCCTCTTT

جدول ۳. پرایمر اختصاصی فیمبریه F5 و الگوی توالی مربوط به آن

اندازه محصول(bp)	پرایمر فیمبریه	الگوی توالی
۳۱٤	F۵(K۹۹)	TATTATCTTAGGTGGTATGG
		GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTTC

برنامه حرارتی بکار رفته به شرح زیر بود:

- واسرشت اولیه زنجیر الگو (Denaturation Early) در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه
- ۳۰ سیکل شامل:
  - Denaturation در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه
  - Annealing در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ٤۵ ثانیه
  - Extension نیز در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷۰ ثانیه
- Extension نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه

برای کنترل مثبت، از سویه ۵۱۰ اشریشیاکلی که از بخش میکرب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شده بود استفاده شد، و برای کنترل منفی نیز در کنار تمام اجزا به جای DNA الگو از آب مقطر استفاده شد.

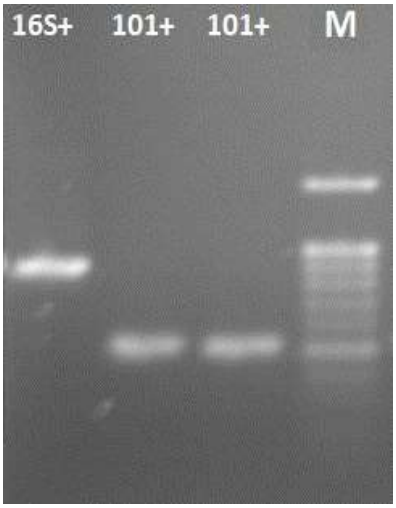
مقدار ۵ میکرولیتر از محصول نهایی در ژل آگارز ۱٪ تهیه شده از بافر TAE ۱٪ الکتروفورز گردید. برای شناسایی وزن مولکولی محصولات از مارکر kbp ۱ استفاده شد. به مدت تقریبی ۳۰–٤۵ دقیقه با ولتاژ ٦۵ نمونه‌ها الکتروفورز شده و به مدت ۲۰ دقیقه در رنگ اتیدیوم بروماید ماند و سپس نتیجه با دستگاه ژل داک شد.

تمامی نمونه‌ها از نظر فراوانی ژن K۹۹ و در ادامه نمونه‌هایی که پس از بررسی ژن تایپ O۱۰۱ منفی بودند به ترتیب اهمیت، از نظر نوع O۸، O۹ و... بررسی شدند.

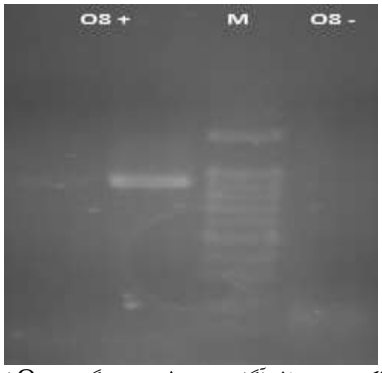
نتایج

براساس آزمایش‌های انجام شده بر روی ٦٤ نمونه مدفوع گوساله مبتلا به اسهال آبکی با عامل باکتری اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک، تمامی نمونه‌ها از نظر فراوانی ژن K۹۹ و در ادامه نمونه‌هایی که پس از بررسی ژن تایپ O۱۰۱ منفی بودند، به ترتیب اهمیت، از نظر نوع O۸، O۹ و... بررسی شدند که ۳٦ نمونه (۵٦٪) جنس نر و ۲۸ نمونه (۳٤٪) جنس ماده بود. در این بررسی از ۱۵ نمونه (۲۳/٤٪) تنها سروگروپ O۱۰۱ جدا شد (نگاره ۱) که البته این سروگروپ در ۲۳ نمونه دیگر با سایر سروگروپ‌ها همراه بود و در مجموع در ۳٦ نمونه (۵٦/۳٪) سروگروپ O۱۰۱ شناسایی شد. سروگروپ O۸ (نگاره ۲) تنها در یک نمونه (۱/۵٪) از نمونه‌ها به تنهایی حضور داشته و به طور کل در ۱۲ نمونه (۱۸/۷٪) شناسایی شد. سروگروپ O۹

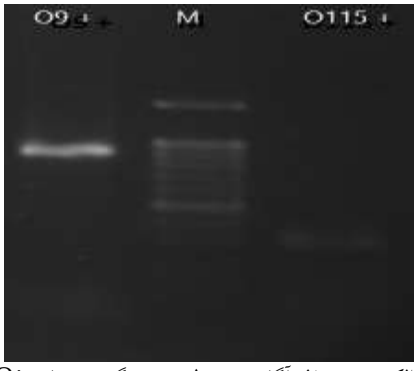
(نگاره ۳) در هیچ یک از نمونه‌ها به تنهایی حضور نداشته و در کل از ٦ نمونه (۹/۳٪) جدا شده است. همچنین سروگروپ O۱۱۵ (نگاره ۳) در ۵ نمونه (۷/۸٪) همانند سروگروپ O۹ با سایر سروگروپ‌ها و در نمونه‌ای از سروگروپ O۱۱۵ ژن K۹۹ حضور داشته است. در مورد حضور ژن K۹۹ (نگاره ٤)، در نمونه مدفوع ٦ گوساله (۹/۳٪) از ٦٤ گوساله اسهالی و در مجموع از ۱۹۲ کلنی بررسی شده حاصل کشت سه کلنی از کشت هر یک از نمونه مدفوع گوساله‌های اسهالی، ۷ کلنی (۳/٦٪) دارای ژن K۹۹ بودند که ۵ نمونه (۸۳/۳٪) از ٦ نمونه از سروگروپ O۱۰۱ جدا شده است. در جدول ٤ حضور ژن‌های K۹۹ و سروگروپ‌های O۸، O۹، O۱۱۵ و O۱۰۱ در کلنی‌های کشت داده شده از نمونه مدفوع‌ها به تنهایی و یا با یکدیگر در یک نمونه آورده شده است(جدول ٤).



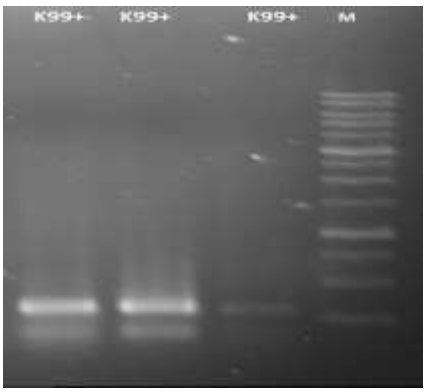
نگاره ۱. الکتروفورز ژل آگارز مربوط به ای کلای ۱٦Sبا اندازه ۸۹۷pbو سروگروپ O۱۰۱ با اندازه ۵۰۷pb



نگاره ۲. الکتروفورز ژل آگارز مربوط به سروگروپO۸با اندازه pb ۱۲۲۳ در ستون سمت چپ



نگاره ۳. الکتروفورز ژل آگارز مربوط به سروگروپ های O۹با اندازه pb ۱۱٤۲و O۱۱۵با اندازه pb ۳۲۷



نگاره ٤. الکتروفورز ژل آگارز مربوط به فیمبریه F۵(K۹۹) با اندازه ۳۱٤pb

جدول ٤. فراوانی ژن های سروگروپ‌ها به تنهایی یا با یکدیگر و فیمبریه K۹۹ در بین نمونه‌های مورد آزمایش

ژن	مشترک باO۸	مشترک با O۹	مشترک با O۱۰۱	مشترک با O۱۱۵	مشترک با سروتیپ نامشخص	K۹۹
O۸	۱	۲	۳	۱	۵	-
O۹	۲	-	۱	-	۳	-
O۱۰۱	۳	۱	۱۵	۱	۱٦	۵
O۱۱۵	۱	-	۱	-	۳	۱
K۹۹	-	-	۵	۱	۱	-

بحث

از آنجا که اسهال در گوساله‌ها مشکل بسیار جدی و مهم بوده و یکی از علل مهم زیان اقتصادی در هر دامداری بواسطه ایجاد مرگ و میر، تحمیل هزینه‌های درمان و کاهش رشد گوساله‌ها است(۱). از بین باکتری‌های انتروپاتوژن، سروتیپ‌های E.Coli از علت‌های بروز سندرم اسهال در نوزادان حیوانات مزرعه هستند که به مجموعه بیماری‌های حاصله کولی باسیلوزیس گفته می‌شود وETEC شایع ترین نوع کلی باسیلوزیس در گوساله‌های نوزاد است(۱۱). توجه و مطالعه بر روی شدت بیماری زایی و عوامل خطر ETEC ضروری است. اگرچه کلی باسیلوزیس در گوساله‌ها شایع است، با این حال آزمایش‌های مولکولی درباره ی شدت بیماری زایی و عوامل خطر همراه آن، تا به امروز در ایران آنچنان که باید انجام نشده است.

در مطالعه حاضر، درصد فراوانی سروگروپ‌های O۸، O۹، O۱۰۱، O۱۱۵ و فیمبریه‌ی K۹۹ در نمونه‌های اخذ شده از گوساله‌های اسهالی به ترتیب ۱۸/۷٪، ۹/۳٪، ۵٦/۳٪، ۷/۸٪ و ۹/۳٪ میباشد. در این مطالعه فراوانی K۹۹ در گوساله‌های اسهالی بیشتر از درصد فراوانی گزارش شده به میزان ۲/٦٪ در مطالعه لطف‌اله‌زاده و همکاران در گوساله‌های اسهالی با عامل اشریشیاکلی و فراوانی ۵/۳٪ در مطالعه‌ی Shams و همکاران و ۰/۵۷٪ در مطالعه Zhang و همکاران بوده و تقریبا مشابه مطالعه Younis و همکاران به میزان ۱۰/۳٪ است، در حالی که در مطالعه Ghanbarpour و Nazem اثری از K۹۹ در گوساله‌های اسهالی یافت نشد (۱٦ و ۱۵، ۱۳، ۷، ۲). همچنین در مطالعات دیگر، Acha و همکاران و Salvadori و همکاران به ترتیب به فراوانی ٤۰٪ و ۷/۳٪ دست یافته‌اند (۱۲ و ۳). در این مطالعه بیشترین فراوانی فیمبریه K۹۹ بین سروگروپ‌ها در سروگروپ O۱۰۱ با ۸۳/۳٪ می باشد. در مطالعه ی مشابه، Shams و همکاران نیز این سروگروپ با فراوانی ٦۲/۵٪ بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده است(۱۳). با توجه به فراوانی سروگروپ O۱۰۱، نه تنها از نظر فراوانی بلکه با توجه به حضور ۸۳/۳٪ از فراوانی ژن K۹۹ به عنوان یکی از عوامل حدت بیماریزایی ETEC در این سروگروپ، مهمترین سروگروپ می‌باشد. حضور ژن K۹۹ در سروگروپ O۱۱۵ که در مطالعات کمتر به آن توجه شده و در این مطالعه فراوانی پایینی دارد قابل توجه است، در مطالعه ی دیگری در ایران، Ghanbarpour و Nazem به فراوانی ٤/۵٪ برای این سروگروپ رسیده‌اند(۷). در مطالعه Contrepois و همکاران از سروگروپ O۱۱۵ به عنوان سروگروپ غیر انتروتوکسیژنیک یاد شده که با توجه به حضور ژن K۹۹ در این سروگروپ می‌توان آن را انترو توکسیژنیک دانست(۵). تفاوت در فراوانی سروگروپ های مختلف در این مطالعه را می‌توان به تفاوت ژنومی آنها و همانطور که پیش تر اشاره شد به حضور برخی از عوامل حدت مانند حضور ژن K۹۹ در بعضی از سروگرپ ها مرتبط دانست. شرایط آب و هوا منطقه‌ای، سن ابتلا به بیماری و فراوانی زایش در دامداری‌های صنعتی (بیشترین فراوانی تابستان و پاییز که کیفیت پرستاری از گوساله‌های نوزاد را تحت تاثیر قرار می دهد) در هنگام نمونه گیری، تعداد نمونه‌های مورد بررسی و تفاوت حساسیت و ویژگی آزمایش‌ها، نتایج را در مطالعه های مختلف تحت تاثیر قرار می‌دهد. علت برتری فراوانی جنس نر بر جنس ماده را در این مطالعه را میتوان تا حدودی به عدم توجه لازم به جنس نر و اهمیت کم تر آن نسبت به جنس ماده در بین کارکنان گوساله دانی دانست که بر روی دقت و توجه لازم در نگهداری گوساله، دادن آغوز و شیردهی تاثیرگذار است.

با توجه به وجود بیشترین تعداد راس دام شیری و بیشترین تولید شیر به صورت صنعتی کشور در دو استان البزر و قزوین، از این مطالعه می‌توان در راستای پیش بینی حضور سروگروپ‌های معمول در بروز بیماری و میزان اهمیت هر

سروگروپ در منطقه در نحوه برخورد با بروز اسهال کلی باسیلوزیس در گله‌ها و در ادامه این مطالعه برای تولید واکسنی با کیفیت برای بدست آوردن آغوزی موثر با تولید ایمونوگلوبین‌های اختصاصی تر در برابر ETEC، کمک گرفت و استفاده نمود.

فهرست منابع

۱. پورتقی شتربان، ه.، ده پهلوان، و.، شقایق، ع.، بدیعی، الف. (۱۳۸۹): شناسایی مولکولی باکتری‌های E.coli انتروتوکسیک جدا شده از گوساله‌های اسهالی استان البرز در سال ۱۳۸۹، مجله پژوهش های بالینی دامپزشکی، ۲ (۱):۳۸-۳۳.

۲. لطف‌اله‌زاده، ص.، ضیایی درونکلایی، ن.، زهرایی صالحی،ت.، پوربخش، س.ع.، مخبر دزفولی، م.ر.، افشاری، غ. (۱۳۸۳): بررسی حضور اشریشیاکلی کوکسیدیا و کریپتوسپوریدیوم در مدفوع تعدادی از گوساله‌های زیر یکماه مبتلا به اسهال از قائم شهر و بابل و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها، مجله دامپزشکی دانشگاه تهران، ۵۹ (۲): ۱۳۶-۱۳۱.

3. Acha, S.J., Kuhn, I., Jonsson, P., Mbazima, G., Katouli, M. (2004): Studies on calf diarrhea in Mozambique: prevalence of bacterial pathogens. Acta. Vet. Scand. 45:27–36.

4. Andrews, A. H., Blowey R. W., Boyd H., Eddy R.G. (2004): Bovine medicine disease and husbandry of cattle 2nd edition. Blackwell Publishing, London. P: 186-230.

5. Contrepois, M., Fairbrother, J.M., Kaura, Y.K., Girardeau, J.P. (1989): Prevalence of CS31A and F165 surface antigens in Escherichia coli isolates from animals in France, Canada and India. FEMS.Microbiol.Lett. 50, 319-323.

6. DebRoy, C., Roberts, E., Fratamico, P.M. (2011): Detection of O antigens in Escherichia coli. Anim. Health Res. Rev. 12(2): 169–185.

7. Ghanbarpour, R., Nazem, M.N. (2010): Prevalence of aerobactin and adhesin genes in Escherichia coli isolates from blood of bacteremic severely ill neonatal calves Vet. Arhiv. 80 (2): 185-194.

8. Liu, W., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J., (1997): Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA Appl. Enriron. Microbial. 63(11): 4516-4522.

9. Nagy, B., Fekete, P.Z. (1999): Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in farm animals. Vet. Res. 30:259–284.

10. Nagy, B., Fekete, P.Z. (2005):Enterotoxigenic Escherichia coli inveterinary medicine. Int. J. Med.Microbiol. 295:443–454.

11. Radostits, O. M., Gay, C.C., Hinchcliff, K. W., Constable, P. D. (2007): Veterinary Medicine A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats 10th edition. Saunders, New York. P: 851-876.

12. Salvadori, M.R., Valadares. G.F., Leite, D.S., Blanco, J., Yano, T. (2003): Virulence factors of Escherichia coli isolated from calves with diarrhea in Brazil. Braz. J. Microbiol. 34:230–235.

13. Shams, Z., Tahamyan, Y., Pourbakhsh, A., Hosseiny, M.H., Kargar, M., Hayati, M. (2010): Detection of entrotoxigenic K99 (F5) and F41 from fecal samples of calves by molecular and serological method. Comp. Clin. Patho. Published online. 21(4): 475–478.

14. Smith, B.P. (2016): Large Animal Internal Medicine 5th edition. Mosby and Elsevier Publishing. Missouri. P: 316.

15. Younis, E.E., El-Naker, Y.F.I. (2009): Molecular screening andrisk factors of enterotoxigenic Escherichia coli and Salmonella spp. in diarrheic neonatal calves in Egypt. Res. Vet. Sci. 87(3):373–379.

16. Zhang, W., Zhao, M., Ruesch, L.,Omot, A., Francis, D. (2007): Prevalence of virulence genes in Escherichia coli strains recently isolatedfrom young pigs with diarrhea in the US. Vet. Microbiol. 123:145–152.