DOI: 10.22092/vj.2017.108717.1248
شماره ۱۱۸ بهار ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی گروه‌های فیلوژنیک باکتری اشریشیا کلی جدا شده ازمدفوع طیور بر اساس ژن‌های *chu, yio, tspe* جدا شده از استان کرمان

• **ملیحه اشراف حسینی**
دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران.
• **میترا صالحی (نویسنده مسئول)**
استادیار گروه میکروب‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
• **بابک خیرخواه**
استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، کرمان، ایران.
• **کیومرث امینی**
استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران.
تاریخ دریافت: ۲۷-۰۹-۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۰۳-۰۵-۱۳۹۶
Email: mitra_salehi_microbiology@yahoo.com

چکیده

اشریشیا کلی یک باکتری گرم منفی روده‌ای و عامل بیماری‌های مهمی در طیور و همچنین در انسان و دارای اهمیت زئونوتیک می‌باشد. این باکتری از لحاظ فیلوژنی به چهار گروه A، B1، B2 و D و زیرگروه‌های بیشتر تقسیم‌بندی می‌شود که این تقسیم‌بندی دارای اهمیت اپیدمیولوژیک می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی شیوع گروه‌های فیلوژنیک اشریشیا کلی در سویه‌های جداسازی شده از مدفوع طیورگوشتی بود. در این مطالعه ۶۰ نمونه اشریشیا کلی جداسازی شده از طیور جمع‌آوری و با آزمون‌های کشت و بیوشیمیایی تایید شدند. آزمون triplex-PCR بر روی جدایه‌ها و با استفاده از ژن‌های *yjaA*، *chuA* و قطعه *TspE4.C2* جهت تعیین گروه‌های فیلوژنی انجام شد. نتایج مطالعه نشان داد گروه فیلوژنی B2 دارای بیشترین فراوانی در بین سویه‌ها بود و فراوانی زیرگروه‌های B23، B22، B1، A1، A0 D1 و D2 به ترتیب ۱۸/۳ درصد، ۸/۳ درصد، ۱/۶ درصد، ۵ درصد، ۴۱/۶ درصد، ۳/۳ درصد و ۱۶/۶ درصد بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد بیشترین سویه‌های اشریشیا کلی جداسازی شده از مدفوع طیور گوشتی متعلق به گروه فیلوژنی B2 بودند که این گروه در انسان نیز از پاتوژن‌های مهم خارج روده‌ای می‌باشد و نشان دهنده اهمیت زئونوتیک جدایه‌های مورد بررسی می‌باشد.

کلمات کلیدی: اشریشیا کلی، گروه فیلوژنی طیور، ژن *chuA*، ژن triplex-PCR، *yjaA*

● Veterinary Researches & Biological Products No 118 pp: 25-30

Stuying phylogenetic groups of Escherichia isolated from poultry feces based on genes *chu, yio, tspe* isolated from Kerman province

By: Ashrafhosseini, M., Department of Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran. Salehi, M., (Corresponding Author) Assistant Professor, Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Kheirkhah, B., Assistant Professor, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran. and Amini, K., Assistant Professor, Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.
Email: mitra_salehi_microbiology@yahoo.com

Received: September 2016 Accepted: December 2016

Escherichia coli is a gram negative enteric bacteria and the causative agent of important diseases in poultry and humans and has zoonotic importance. This bacteria is divided into four phylogenetic groups including A1, B1, B2 and D and more subgroups which has epidemiologic importance. The aim of study is to evaluate the prevalence of phylogenetic groups of *E. coli* strains isolated from poultry feces. In this study 60 samples of *E. coli* isolated from poultry were collected and confirmed by culture and biochemical tests. Triplex-PCR was done on the isolates and by *chuA, yjaA* genes and *TspE4.C2* to determine the phylogenetic groups. The results of the study showed the phylogroup B2 was the most group identified and the subgroups A0, A1, B1, B22, B23, D1 and D2 were observed in 18.3%, 8.3%, 1.6%, 5%, 41.6%, 3.3% and 16.6% of the isolates. This study showed the most strains of *E. coli* isolated from feces of poultry belonged to B2 phylogenetic group which is an exteraintestinal pathogen group in humans and shows the zoonotic importance of these isolates.

Key words: *Escherichia coli*, phylogenetic group poultry, *chuA* gene, *yjaA* gene, triplex-PCR

مقدمه

اشریشیا کلی یک باسیل گرم منفی روده‌ای است که انتشار وسیعی داشته و در سراسر دنیا در بین حیوانات خونگرم وجود دارد و به عنوان فلور نرمال روده شناخته می‌شود. این باکتری غیرمهاجم که در روده حیوانات و انسان یافت می‌شود از رشد و گسترش سایر باکتری‌های بیماری زا در روده جلوگیری می‌کند. این باکتری در طیور عامل بیماری بسیار مهمی به نام کلی باسیلوز می‌باشد که از علائم آن می‌توان به التهاب کیسه‌های هوایی، سلولیت، پریکاردیت، پری هپاتیت و دیسترس تنفسی اشاره کرد (۲۳). به علاوه این باکتری عامل بیماری‌های مهمی در انسان نیز می‌باشد. این باکتری اولین بار در سال ۱۹۹۰ با روش Multilocus enzyme electrophoresis به چهار گروه فیلوژنیک A، B1، B2 و D تقسیم شد (۱۳). این یافته در سال ۱۹۹۵ با مقایسه مارکرهای ژنتیکی متعددی مورد تایید قرار گرفت (۸). اما با این حال این تقسیم‌بندی فیلوژنیکی با این روش‌ها بسیار پیچیده و زمان بر بود (۳). ژن *chuA* در انتقال آهن در سویه انتروهموراژیک O۱۵۷:H۷، *yjaA* در پاسخ سلولی به هیدروژن پروکسید و استرس اسیدی نقش دارند و برای *TspE4.C2* نیز نقشی شناخته نشده است (۱۸). هر کدام از چهار گروه، مشخصات فنوتیپی متفاوتی شامل مصرف قندهای متفاوت، مقاومت آنتی بیوتیکی و دمای رشد متفاوتی دارند (۱،۱۳). این روش ۸۵-۹۰ درصد با روش‌های ریبوتایپینگ و enzyme electrophoresis Multilocus همخوانی داشت (۱۲). Clermont و همکاران در سال ۲۰۱۳ با بررسی بر روی نمونه‌های اشریشیا کلی بعد از تعیین توالی ژنوم به هفت فیلوگروه تقسیم‌بندی نمودند که شامل گروه‌های زیرگروه‌های A، C، D، E، B2، B1 و F می‌باشند (۴). به علاوه نشان داده شد سویه‌های مقاوم در محیط به گروه B1 تعلق دارند و گروه‌های B2 و D فاکتورهای حدت بیشتری از سایر گروه‌ها دارند (۱۶، ۲۴). گروه‌های فیلوژنی A و B1 بیشتر در بین سویه‌های کمنسال یافت می‌شوند در حالی که سویه‌های انتروپاتوژن بیشتر در گروه D و پاتوتیپ‌های خارج روده‌ای در گروه B2 قرار می‌گیرند (۲۲). کاظم‌نیا و همکاران در سال ۲۰۱۴، با بررسی بر روی اشریشیا کلی جدا شده از عفونت‌های ادراری انسانی و طیور به این نتیجه رسیدند که بیشتر سویه‌های طیور متعلق به گروه A بوده است (۲۰). درخشنده و همکاران در سال ۲۰۱۴، سویه‌های اشریشیا کلی جداسازی شده از انسان و حیوانات مختلف را از لحاظ گروه فیلوژنی مورد بررسی قرار دادند که در نتایج مشخص گردید که از ۳۶ سویه طیور مورد بررسی، بیشتر سویه‌ها متعلق به گروه D و زیرگروه D1 بودند (۶). شناسایی گروه‌های فیلوژنی *E. coli* دارای اهمیت اپیدمیولوژیک می‌باشد و تاکنون مطالعات کمی در مورد شیوع این گروه‌های فیلوژنیک در سویه‌های *E. coli* جداسازی شده از طیور در ایران انجام شده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی حضور گروه‌های فیلوژنی سویه‌های اشریشیا کلی جداسازی شده از مدفوع طیور می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق که در قالب یک طرح توصیفی- مقطعی انجام شد، ۶۰ نمونه اشریشیا کلی جداسازی شده از مدفوع طیور گوشتی در سطح ۴۰

مرغداری استان کرمان که بر حسب تصادف از نظر جغرافیایی واقع شده بودند، جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده از مرغداری‌ها از نمونه‌هایی که دارای علائم اسهال بوده و از گله جدا شده بودند اخذ شده و سپس بر روی محیط‌های بلاد آگارو مک کانکی آگارو EMB آگار کشت داده شده تشخیص باکتری اشریشیا کلی با روش‌های میکروب‌شناسی شامل رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز و اکسیداز و استفاده از محیط‌های افتراقی مانند MRVP، SIM، TSI سیمون سیترات، فنیل آلانین آگار، اوره و نیز تست‌های تکمیلی بیوشیمیایی مانند تخمیر قندها و استفاده از آمینواسیدها انجام شد.

استخراج DNA نمونه‌ها توسط کیت شرکت سیناژن و مطابق دستورالعمل کیت انجام گرفت. پس از استخراج نسبت به تکثیر DNA الگو به روش PCRtriplex اقدام شد. آزمون PCR بر روی ۶۰ جدایه اشریشیا کلی برای ژن‌های *yjaA*، *Chu* و قطعه *TspE4.C2* انجام گرفت (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR استاندارد در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر 10XPCRBuffer، ۰/۸ میکرولیتر $MgCl_2$، یک میکرولیتر dNTP، ۰/۸ میکرولیتر از هر پرایمر (با غلظت ۱۰ پیکومول)، ۱۴/۳ میکرولیتر آب مقطر، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase و پنج میکرولیتر از DNA الگو انجام گردید. برنامه حرارتی جهت انجام واکنش‌های PCR عبارت بود از واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، ۳۵ سیکل هرکدام شامل: واسرشت در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، امتداد در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و نیز امتداد نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه (۴ و ۳). محصولات PCR در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند، با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند و تحت نور UV مشاهده و مستندسازی شدند. به عنوان استاندارد کنترل مثبت، نمونه اشریشیا کلی J96B2 از آزمایشگاه میکروب‌شناسی پاسارگاد تهیه گردید.

نتایج

تمامی نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از آزمایشات کشت و بیوشیمیایی بررسی و مطابق با استانداردهای تشخیصی به عنوان اشریشیا کلی تایید گردیدند. گروه فیلوژنی جدایه ها بر اساس جدول ۲ به گروه‌های A0، D1، B23، B22، B1، A1 و D2 تعیین شد. بر اساس دارا بودن ژنهای مورد بررسی در آزمون triplex-PCR گروههای فیلوژنیکی جدایه‌ها مطابق جدول ۳ بر اساس تعداد و درصد مشخص گردید. فراوانترین گروه فیلوژنی جدایه‌ها مربوط به گروه B23 با ۴۱/۶ درصد بوده است. گروههای فیلوژنی شناسایی شده در روش ملکولی مطابق تصویر ۱ کاملاً گویای این مطلب است که گروه B2 دارای بیشترین فراوانی (۴۶/۶٪) و گروه فیلوژنی B1 دارای کمترین فراوانی (۱/۶٪) بوده‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

اشریشیا کلی یکی از باکتری‌های دخیل در بیماری‌های مختلفی در طیور و همچنین در انسان می‌باشد (۲۳). این باکتری به چهار گروه فیلوژنیک تقسیم می‌شود که هر کدام خصوصیات اکولوژیکی متفاوتی دارند و قادر به ایجاد بیماری‌های متفاوتی هستند (۱۳، ۲۴). بنابراین شناسایی جمعیت میکروبی جهت شناسایی اپیدمیولوژی بیماری‌های عفونی ضروری می‌باشد. در مطالعه حاضر اکثر نمونه‌ها متعلق به گروه فیلوژنی B2 بوده است. همانگونه که در مطالعات قبلی مشخص گردید، گروه فیلوژنی B2 بسیار پاتوژن هستند و عامل بیماری‌های خارج روده‌ای در انسان می‌باشند (۱۷). گروه فیلوژنی D نیز در گروه پاتوژن‌های خارج روده‌ای قرار می‌گیرد اما بیماری‌زایی کمتری نسبت به گروه B_2 دارد (۳). در مطالعات مختلفی که در نقاط مختلف ایران و جهان انجام شده درصدهای متفاوتی از گروه‌های فیلوژنیک بدست آمده است. در مطالعه کاظم‌نیا و همکاران در سال ۲۰۱۴، ۲۵ سویه *E. coli* جداسازی شده از طیور و ۲۵ سویه جداسازی شده از عفونتهای ادراری انسانی مورد بررسی فیلوژنی قرار گرفتند و بیشترین سویه‌های طیور متعلق به گروه A (۳۶ درصد) بودند و فراوانی گروه‌های B2، B1 و D به ترتیب ۱۶، ۲۸ و ۲۰ درصد بود (۲۰). در مطالعه درخشنده و همکاران در سال ۲۰۱۴،

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق (٤ و ۳).

ژن	توالی (۵' به ۳')	اندازه محصول
chuA	F-GACGAACCAACGGTCAGGAT R-TGCCGCCAGTACCAAAGACA	۲۷۹
yjaA	F-GACGAACCAACGGTCAGGAT R-TGCCGCCAGTACCAAAGACA	۲۱۱
TspE4.C2	F-GACGAACCAACGGTCAGGAT R-TGCCGCCAGTACCAAAGACA	۱۵۲

سویه‌های اشریشیا کلی جداسازی شده از انسان و حیوانات مختلف مورد از لحاظ گروه فیلوژنی مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه از ۳۶ سویه طیور مورد بررسی بیشترین سویه‌ها متعلق به گروه D و زیرگروه D۱ (۵۰ درصد) بودند و زیرگروه‌های A0، B22 و D2 به ترتیب ۳۶/۱ درصد، ۱۱/۱ درصد و ۲/۸ درصد جدایه‌ها را شامل می‌شدند (۶). نخعی و همکاران در سال ۲۰۱۵، شیوع گروه‌های فیلوژنی مختلف در بین۱۷۱ جدایه اشریشیا کلی طیور را مورد بررسی قرار دادند. نتایج مشخص نمود که گروه‌های B2، A، B1 و D هرکدام به ترتیب ۳۱/۷ درصد، ۲۱/۶ درصد، ۲۵/۲ درصد و ۲۱ درصد فراوانی را در بین جدایه‌ها شامل می‌شدند. همچنین در مطالعه آن درصد ها مشخص شد گروه B2 بیشترین فراوانی را در بین سویه‌های جداسازی شده از موارد بیمار داشته، در حالی‌که در سویه‌های جداسازی شده از طیور سالم بیشترین گروه یافت شده گروه‌های A و B۱ بودند (۲۱) اما در مطالعه قنبرپور و صالحی در سال ۲۰۱۰ بر روی سویه‌های اشریشیا کلی جداسازی شده از سالپنژیت طیور، بیشترین فراوانی مربوط به گروه فیلوژنیک A و D (۷۵ درصد) گزارش گردید (۱۱). در مطالعه Hussein و همکاران در سال ۲۰۱۳ در کشور مصر، ۱۵۳ سویه اشریشیا کلی بیماری‌زای طیور و ۳۰ سویه اشریشیا کلی مدفوعی طیور مورد بررسی فیلوژنی قرار گرفتند. در این مطالعه گروه‌های A، B1 و D بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند (۱۴). در مطالعه Eweres و همکاران سویه‌های Avain Pathogenic، سویه‌های مدفوعی و محیطی مورد بررسی فیلوژنی قرار گرفتند. در نتیجه عنوان شد که گروه B2 بیشترین فراوانی را در سویه‌های APEC و گروه‌های D و A بیشترین فراوانی را در سویه‌های مدفوعی و محیطی داشتند (۱۰). Jeong و همکاران در سال ۲۰۱۲، به بررسی گروه‌های فیلوژنیک در اشریشیا کلی جداسازی شده از جوجه‌های مبتلا به کلی‌باسیلوز در کشور کره پرداختند و گزارش نمودند که ۳۹/۵ درصد جدایه‌ها با بیشترین فراوانی متعلق به گروه A بوده که مهم‌ترین گروه بیماری‌زای خارج روده‌ای در انسان می‌باشد و از این جهت طیور عامل مهمی در انتقال این سویه‌ها به انسان شناخته شدند (۵). در بررسی فیلوژنیک Carvalho و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی سویه‌های اشریشیا کلی جداسازی شده از سگ‌ها و صاحبان آن‌ها نشان داده شده گروه A بیشترین فراوانی را در هر دو گروه داشته و سویه‌های جداسازی شده از هر دو گروه مشابهت زیادی را نشان داده است (۲). در مطالعه Derakhshandeh و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی سویه‌های اشریشیا کلی یوروپاتوژن انسانی، ۶۷/۶۴ درصد به گروه A

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق (٤ و ۳).

گروه فیلوژنی	تعداد	درصد
A۰	۱۱	۱۸/۳
A۱	۵	۸/۳
B۱	۱	۱/۶
B۲۲	۳	۵
B۲۳	۲۵	۴۱/۶
D۱	۲	۳/۳
D۲	۱۰	۱۶/۶

جدول ۲- گروه‌ها و زیرگروه‌های فیلوژنی جدایه‌های مورد بررسی

ژن	A۰	A۱	B۱	B۲۲	B۲۳	D۱	D۲
chuA	-	-	-	+	+	+	+
yjaA	-	+	-	+	+	-	_
TspE4.C2	-	-	+	-	+	-	+

تعلق داشتند و ۱۷/۶۴ و ۱۴/۷ درصد جدایه‌ها به ترتیب به گروه‌های B2 و D متعلق بودند (۹). مطالعه مشابهی توسط باپونی و همکاران در سال ۱۳۹۵ در شهر ارومیه انجام شد. نتایج این مطالعه نیز نشان داد گروه B2 دارای بیشترین فراوانی (۴۰ درصد) و گروه‌های B1، A و D هرکدام به ترتیب ۳۰، ۱۲ و ۱۸ درصد جدایه‌ها را شامل می‌شوند (۲). در مطالعه Liu و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی نمونه‌های اشریشیا کلی جداسازی شده از نمونه‌های ورم پستان در گاو، گروه A بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده بود (۱۵). کریمی و همکاران در سال ۱۳۹۲ سویه‌های اشریشیا کلی جداسازی شده از غذاهای منجمد با منشا دامی و سویه‌های جداسازی شده از اسهال کودکان را مورد بررسی فیلوژنیک قرار دادند. در این مطالعه بیشترین گروه فیلوژنیک یافت شده در هر دو گروه، گروه فیلوژنیک A بود که می‌تواند نشان‌دهنده انتقال این سویه از غذای مصرفی به کودکان باشد (۱۹). توزیع گروه‌های فیلوژنیک مختلف در مطالعات مختلف می‌تواند ناشی از چند عامل باشد: شرایط جغرافیایی و آب و هوایی، شرایط تغذیه‌ای یا مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و ژنتیک میزبان از این جهت که سویه‌های *E. coli* ممکن است به شرایط روده جمعیت‌های مختلف عادت پیدا کنند (۷). نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده بیشترین فراوانی گروه B2 فیلوژنیک در سویه‌های اشریشیا کلی جداسازی شده از مدفوع طیور بوده است که این گروه فیلوژنی از عوامل بسیار مهم پاتوژن در انسان نیزمی‌باشد و اهمیت زئونوتیک فراوانی دارد.

منابع مورد استفاده

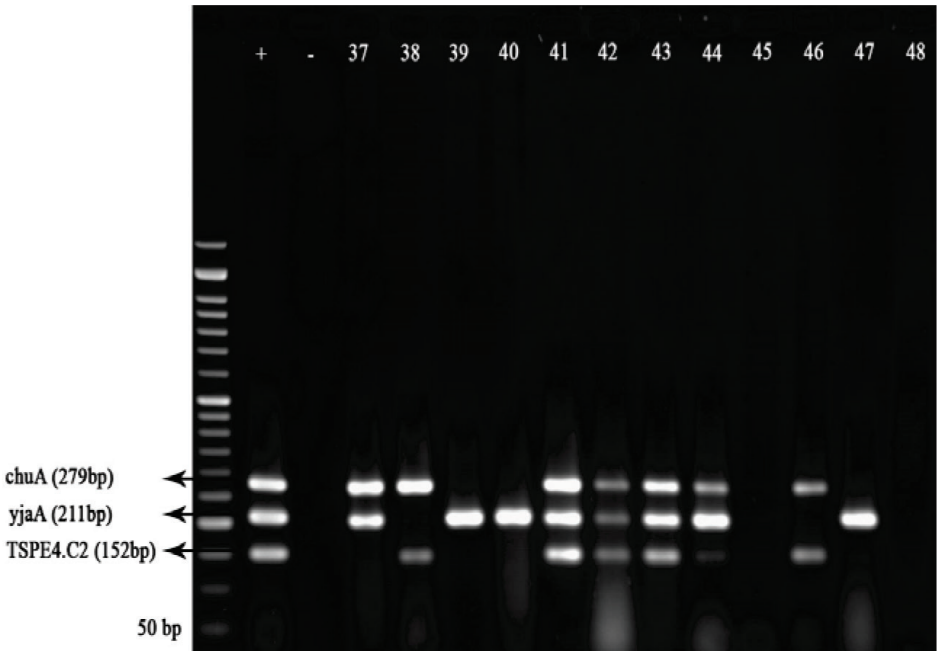
1. Ghanbarpour, R., Daneshdoost, S. (2012). Identification of Shiga toxin and intimin coding genes in *Escherichia coli* isolates from pigeons (*Columba livia*) in relation to phylotypes and antibiotic resistance patterns. *Trop Anim Health Prod*; 44(2), 307-312.

2. Carvalho, A. C., A. V. Barbosa, L. R. Arais, P. F. Ribeirob, V. C. Carneiro, A. M. F. Cerqueir. (2016). Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of *Escherichia coli* from dogs and owners; *Braz J Microbiol*; 47: 150–158.

3. Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group; Appl Environ Microbiol; 66: 4555-4558.

4. Clermont, O., J. K. Christenson, E. Denamur and D. M.Gordon. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylotyping method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups; *Env Microbiol Reports*; 5: 58-65.

5. Jeong, Y. W., Kim, T. E., Kim, J. H., & Kwon, H. J. (2012). Pathotyping avian pathogenic *Escherichia coli* strains in Korea. *J vet sci*; 13(2), 145-152.



شکل ۱- نتایج آزمون PCR جهت تعیین گروه‌های فیلوژنی از چپ به راست: Ladder100bp، کنترل مثبت اشریشیا کلی J96B2، کنترل منفی، نمونه‌های ۳۷- ۴۸ دارای ژنهای *chuA* با طول محصول *yjaA*، 279bp با 211 *TspE4.C2*، bp با bp.152

6. Derakhshandeh, A., R. Firouzi and Z Naziri. (2014). Phylogenetic group determination of faecal *Escherichia coli* and comparative analysis among different host; *IJVR*; 15(1): 13-17.
7. Duriez, P., O. Clermont, S. Bonacorsi, E. Bingen, A. Chaventré, J Elion, B. Picard and E. Denamur. (2001). Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations; *Microbiology*; 147: 1671-1676.
8. Desjardins, P., B. Picard, B. Kaltenbock, J. Elion and E. Denamur. (1995). Sex in *Escherichia coli* does not disrupt the clonal structure of the population: evidence from random amplified polymorphic DNA and restrictionfragment-length polymorphism; *J MolEvol;* 40: 440-448.
9. Derakhshandeh, A., Firouzi, R., Moatamedifar, M., Motamedi, A., Bahadori, M., Naziri, Z. (2013). Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains isolated from human samples. *Mol Biol Res Communi;* 2(4), 143-149.
10. Ewers, C., E. M. Antao, I. Diehl, H. C. Philipp and L. H. Wieler. (2009). Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential; *Appl Env Microbiol;* 75(1): 184–192.
11. Ghanbarpour, R. and M. Salehi. (2010). Virulence genotyping of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis in relation to phylogeny; *Comp Clin Pathol;* 19(2): 147–153.
12. Gordon, D. M. (2004). The influence of ecological factors on the distribution and genetic structure of *Escherichia coli*. In Escherichia coli and *Salmonella typhimurium.* American Society for Microbiology.
13. Herzer, P. J., S. Inouye, M. Inouye and T. S. Whittam. (1990). Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli; J Bacteriol*; 172: 6175-6181.
14. Hussein, A. H. M., I. A. I. Ghanem, A. A. M. Eid, M. A. Ali, J. S. Sherwood, G. Li, L. K. Nolan and C. M. Logue. (2013). Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken flocks in Egypt; *Avian Dis*; 57(3): 602-611.
15. Liu, Y., Liu, G., Liu, W., Liu, Y., Ali, T., Chen, W., Han, B. (2014). Phylogenetic group, virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* associated with bovine mastitis. *Res Microbiol*; 165(4), 273-277.
16. Johnson, J. R., P. Delavari, M. Kuskowski and A. L. Stell. (2001). Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli; J Infect Dis*; 183: 78-88.
17. Lecointre, G., L., Rachdi, P. Darlu and E. Denamur. (1998). *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test; *Mol Biol Evol;* 15: 1685-1695.
18. Martins, R. P., da Silva, M. C., Dutra, V., Nakazato, L., da Silva Leite, D. (2013). Preliminary virulence genotyping and phylogeny of *Escherichia coli* from the gut of pigs at slaughtering stage in *Brazil. Meat sci;* 93(3),437-440.
19. KarimiDarehabi, H., M. H. Naseri, S. Menbari, J. Mobaleghi and E. Kalantar. (2013). Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* groups A, B1, B2 and D isolated from frozen foods and children with diarrhea in Sanandaj, Iran*; Int J Enter Pathog;* 1(1): 1-4.
20. Kazemnia, A., M. Ahmadi and M. Dilmaghani. (2014). Antibiotic resistance pattern of different *Escherichia coli* phylogenetic groups isolated from human urinary tract infection and avian colibacillosis; *Iran Biomed J;* 18 (4): 219-224.
21. Nakhaee, P., S. M. Peighambari and J. Razmyar. (2015). Phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from broilers and layers with colibacillosis; *Iran J Vet Sci Tech*; 7(1): 12-21.
22. Sabarinath, A., K. P. Tiwari, C. Deallie, G. Belot, G. Vanpee, V. Matthew, R. Sharma and H. Hariharan. (2011). Antimicrobial resistance and phylogenetic groups of commensal *Escherichia coli* isolates from healthy pigs in Grenada. *Webmed Central Veterinary Medicine* 2(5): 1942.
23. Hungerford, T. G. (1961). Respiratory diseases of poultry. *Aust Vet J*; 37(4), 93-96.
24. Walk, S. T., E. W. Alm, EW, L. M. Calhoun, J. M. Mladonicky and T. S. Whittam. (2007). Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches; *Environ Microbiol*; 9: 2274-2288.