

ارتباط جهش در ژن های *gyr A* و *par C* و مقاومت نسبت به فلوروکینولون ها در سویه های *E. coli* جدا شده از عفونت های ادراری

الهام سیاسی*، فرزانه حسینی، پویه رحیمی نیا

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

چکیده:

سابقه و هدف: عفونت ادراری از شایع ترین بیماری هایی است که باکتری های خانواده *انتروباکتریاسه* ایجاد می نمایند و از این باکتری ها، *E. coli* ۹۰٪ موارد را شامل می شود. هدف یافتن علل مقاومت به فلوروکینولون ها که رایج ترین آنتی بیوتیک در درمان این عفونت ها است، می باشد.

مواد و روش ها: ۱۰۰ نمونه ادراری جمع آوری شد و با آزمون های بیوشیمیایی بررسی شدند. سپس برای نمونه های *E. coli* ایزوله شده تست مقاومت آنتی بیوتیکی انجام شد و میزان مقاومت آن ها به آنتی بیوتیک های فلوروکینولونی سنجیده شد. سپس سویه های مقاوم برای وجود جهش در ژن های کروموزومی *gyr A* و *par C* با روش PCR و Sequencing بررسی شدند.

یافته ها: از میان ۱۰۰ نمونه، ۷۰ مورد باکتری *E. coli* و ۳۰ مورد باکتری *کلبسیلا* جدا سازی شد. با انجام تست آنتی بیوگرام روی ۷۰ مورد باکتری *E. coli*، حدود ۴۵ نمونه (۶۴/۲۸ درصد) به آنتی بیوتیک های خانواده فلوروکینولون ها مقاوم بودند. تکثیر و تعیین توالی ژن های *gyr A* و *par C* در نمونه های مقاوم، به ترتیب حضور ۵ و ۲ جهش را در ناحیه خاصی از ژن های مذکور نشان داد.

نتیجه گیری: آنتی بیوتیک های فلوروکینولونی از داروهای مؤثر در درمان عفونت های ادراری هستند و جهش در ژن های کد کننده DNA ژیراز و توپوایزومراز IV در *E. coli* با ایجاد مقاومت به فلوروکینولون ها مرتبط است. نتایج این تحقیق نشان داد که بین مقاومت به کینولون ها و جهش در ناحیه خاص ژن های *gyr A* و *par C* از *E. coli* ارتباط معنی داری وجود دارد.

کلمات کلیدی: ژن *gyr A* و *par C*، فلوروکینولون ها، عفونت ادراری، *E. coli*.

مقدمه

عفونت ادراری یکی از شایع ترین بیماری هایی است که هر فردی در طول زندگی خود احتمال دارد به آن مبتلا شود.

باکتری های خانواده *انتروباکتریاسه* از عوامل اصلی ایجاد این عفونت هستند و در میان آن ها باکتری *E. coli*^۱ حدود ۹۰ درصد را شامل می شود (۸، ۱۵). *شریشیاکلی* بخشی از فلور طبیعی روده انسان و حیوان ها است. ولی گاهی توسط فاکتورهای بیماری زایی خود، توانایی بیماری زایی پیدا می کند. این ارگانیزم عامل اصلی عفونت های مجاری ادراری^۱ (UTI)، مننژیت و گاستروانتریت می باشد (۱۴). یکی از انواع داروهایی که برای درمان عفونت های حاصل از این خانواده - های باکتریایی و به خصوص *E. coli* مورد استفاده قرار می گیرد، کینولون ها و فلوروکینولون ها می باشند.

نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

تهران، ایران

پست الکترونیکی: emi_biotech2006@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۲۲

پذیرفته است. این جهش‌ها بسیار در ناحیه‌ای که منطقه تعیین مقاومت به کینولون (QRDR)^۱ نام دارد یافت می‌شوند (۹،۶). *E. coli* یک باکتری حساس نسبت به فلوروکینولون‌ها محسوب می‌شود اما به تازگی روند مقاوم شدن را در پیش گرفته است. در سال ۲۰۰۰ حدود ۷ درصد از نمونه‌های *E. coli* گرفته شده از ایالات متحده آمریکا نسبت به ۳۰ مورد از این داروها مقاومت نشان دادند و حدود ۳ درصد تا ۴ درصد از آن‌ها نسبت به سیپروفلوکساسین مقاوم شناخته شده‌اند. مقاومت نسبت به فلوروکینولون‌ها در اسپانیا در طی سال‌های ۱۹۹۰ تا ۱۹۹۸ در *E. coli* جدا شده از نمونه عفونت ادراری از ۳ درصد به ۲۳ درصد افزایش یافته بود. در کشور تایوان ۱۱ درصد از ۱۲۰۰ نمونه جدا سازی شده به فلوروکینولون‌ها مقاوم بوده اند و ۲۲ درصد از نمونه‌ها، حساسیت‌شان به این داروها کاهش یافته بود (۱۰، ۱۳). در باکتری‌های گرم منفی نظیر *E. coli* و *کلبسیلا*، فلوروکینولون‌ها به طور عمده مانع از عمل DNA ژیراز می‌شوند، در حالی‌که در ارگانیسم‌های گرم مثبت مثل *استافیلوکوکوس اورئوس*، توپوایزومراز IV هدف اصلی می‌باشد. در *E. coli* میزان مورد نیاز از فلوروکینولون‌ها که بتواند فعالیت DNA ژیراز را ۵۰ درصد کاهش دهد ۴ تا ۸ برابر کم‌تر از میزانی است که برای جلوگیری از فعالیت توپوایزومراز IV مورد نیاز است. در هر دسته از میکرو ارگانیسم‌ها میزان حداقل غلظت جلوگیری کننده از رشد، بسیار نزدیک به میزان دارویی است که برای کاهش ۵۰ درصد فعالیت آنزیم نیاز است، پس نتیجه می‌شود که MIC فلوروکینولون‌ها به وسیله فعالیت آن‌ها بر علیه هدف اولیه آن‌ها مشخص می‌شود (۱۳، ۱۷).

هدف از این تحقیق بررسی ارتباط بین مقاوم شدن باکتری *E. coli* ایجاد کننده عفونت‌های ادراری نسبت به آنتی بیوتیک‌های خانواده فلوروکینولون‌ها و حضور جهش در دو ژن *gyr A* و *par C* که دارای نواحی مقاومت نسبت به کینولون‌ها هستند، می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۱- جمع آوری نمونه ادراری: در این مطالعه پژوهشی، تعداد ۱۰۰ نمونه مبتلا به عفونت ادراری از مراکز درمانی، بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های دولتی و خصوصی شهر تهران

کینولون‌ها و فلوروکینولون‌ها، آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیفی می‌باشند که هم در انسان و هم در حیوان‌ها و دامپزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این خانواده از داروها بر روی طیف وسیعی از باکتری‌ها تأثیر می‌گذارند (۱). در سال‌های اخیر استفاده از داروهای ضد میکروبی به ویژه خانواده فلوروکینولون‌ها از جمله سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید برای درمان عفونت‌های مجاری ادراری در اکثر کشورها در حال افزایش است و استفاده بیش از حد مجاز این داروها منجر به ایجاد مقاومت و ناموفق بودن درمان شده است. ظهور مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در میان پاتوژن‌ها به ویژه در مراکز درمانی و بیمارستان‌ها به معضل بزرگ در رابطه با سلامت عمومی تبدیل شده است (۲،۱). مکانیسم مقاومت در *E. coli* برای داروهای ضد میکروبی مختلف، متفاوت است ولی مطالعه‌های اخیر نشان می‌دهد که این باکتری در بیش‌تر مواقع به اغلب آنتی بیوتیک‌ها به خصوص کینولون‌ها مقاوم شده‌اند. علت اصلی ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک‌های فلوروکینولونی جهش در ژن‌های کد کننده زیر واحدهای A و B، در دو آنزیم DNA ژیراز و توپوایزومراز IV است، بنابراین چنین نتیجه می‌شود که این دو آنزیم هدف اصلی فلوروکینولون‌ها هستند که در باکتری *E. coli* مربوط به تغییر اهداف آنزیمی فلوروکینولون‌ها در اثر جهش می‌باشد (۴). DNA ژیراز یک آنزیم تترامریک می‌باشد که دارای دو زیر واحد A و دو زیر واحد B می‌باشد که به ترتیب توسط ژن‌های *gyr A* و *gyr B* کد می‌شوند و باعث باز شدن پیچش منفی DNA می‌شود. توپوایزومراز IV نیز یک آنزیم تترامریک بوده و از دو زیر واحد C و دو زیر واحد E تشکیل شده است که به ترتیب توسط ژن‌های *par C* و *par E* کد می‌شوند و نقش آن‌ها شرکت در جدا شدن کروموزوم دختری در همانند سازی ژنوم می‌باشد (۵، ۷). مقاومت ناشی از موتاسیون‌های نقطه‌ای که به صورت خود به خودی ایجاد می‌شوند و باعث تعویض آمینواسیدها در ژن‌های DNA ژیراز و توپوایزومراز IV می‌شود، اغلب هم زمان با کاهش بیان منافذ ورودی غشاء و بیان بیش از اندازه سیستم پمپ‌های انتشار همراه است. این عمل به این علت صورت می‌گیرد که میکروارگانیسم سعی دارد تا غلظت ماده آنتی بیوتیکی را در قسمت داخل سلول به حداقل رساند. مطالعه‌ها نشان داده اند که جهش‌هایی که باعث القای مقاومت به کینولون‌ها می‌شوند در زیر واحد A، DNA ژیراز صورت

سریع، آسان و دقیق برای استخراج و خالص سازی ژنوم را فراهم آورده است.

۵- واکنش زنجیره ای پلی مرز: برای انجام واکنش PCR و تکثیر ناحیه خاص از ژن های *gyr A* و *par C* که مقاوم به کینولون ها می باشد، مواد مورد نیاز برای واکنش PCR به حجم $25 \mu\text{l}$ برای هر ویال تهیه گردید که شامل بافرهای مخصوص $5 \mu\text{l}$ PCR، پرایمر راست و چپ هر یک $1 \mu\text{l}$ ، نمونه DNA $1 \mu\text{l}$ ، آنزیم Taq پلیمرز $2.5 \mu\text{l}$ و آب مقطر بود. برنامه دستگاه PCR برای تکثیر این ژن ها عبارت بود از، مرحله واسرشتگی اولیه 95°C درجه سانتی گراد 5 دقیقه، مرحله واسرشتگی 95°C درجه سانتی گراد 30 ثانیه، مرحله اتصال 64°C درجه سانتی گراد 1 دقیقه، مرحله طویل شدن 72°C درجه سانتی گراد 70 ثانیه و مرحله طویل شدن نهایی 72°C درجه سانتی گراد 10 دقیقه، که این برنامه 35 چرخه تکرار شد. پس از انجام PCR برای مشاهده صحت سایز قطعه های حاصل از تکثیر ژن ها، از دستگاه الکتروفورز و ژل آگاروز 1.5% و رنگ آمیزی اتیدیوم برامید استفاده گردید (در این آزمون به علت این که ناحیه خاص از ژن های *gyr A* و *par C* که مقاوم به کینولون ها می باشد (QRDR) از نمونه های مقاوم به آنتی بیوتیک تکثیر داده شده است، تشکیل باند مربوط به ژن های *gyr A* و *par C* در مقابل مارکر مولکولی تأیید حضور ژن های مذکور در نمونه های مقاوم می باشد (به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد) و از ویال PCR بدون نمونه DNA (که در آن به جای DNA همان حجم آب مقطر افزوده شده است) به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد نظر برای دو ژن *gyr A* و *par C*

ژن	توالی پرایمرها در جهت 5' - 3'	طول قطعه تکثیر یافته	رفرنس
<i>gyr A</i>	F- GAATCCGGGATACAGTAGAGGG ATAG R- GGAATTTTGGTTGGCATGACGTC CGGA	480-bp	(۱۸)
<i>par C</i>	F- GTATGCGATGTCTGAACTGGGC CTG R- ACCGGGATTCGGTGTAAACGCATT GC	235 bp	(۱۷)

۶- تعیین توالی ژن های *gyr A* و *par C*: قطعه های تکثیر شده از ژن های *gyr A* و *par C* با PCR، پس از

جمع آوری شد. نمونه گیری ها از بیمارستان شهید لبافی نژاد، بیمارستان شهید چمران، بیمارستان خاتم الانبیاء، بیمارستان مدرس، درمانگاه الغدیر، آزمایشگاه خصوصی قلهدک و آزمایشگاه خصوصی نیک، در مدت 2 ماه انجام پذیرفت.

۲- کشت و جدا سازی: جهت کشت از محیط هایی مانند بلاد آگار و محیط های افتراقی از قبیل اندول، مک کانکی، انوزین متیلین بلو، سیمون سیترات، اوره از، MR-VP، BHI، TSI، SIM و مولر هینتون آگار استفاده شد. محیط های کشت برای ایجاد کلنی باکتری ها به مدت $24-18$ ساعت در دمای 37°C درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

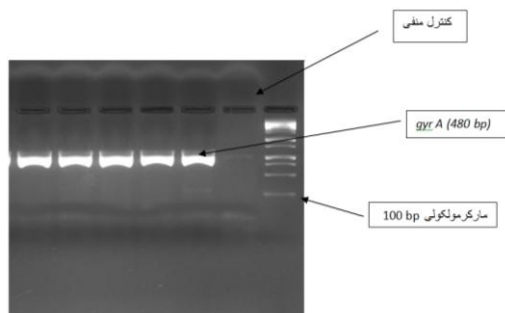
۳- سنجش میزان مقاومت آنتی بیوتیکی: بعد از حصول اطمینان از نوع باکتری مورد نظر سنجش مقاومت باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک های خانواده فلوروکینولون ها تعیین گردید. آنتی بیوتیک های مورد آزمایش از خانواده فلوروکینولون ها عبارت بودند از: نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین، افلوکساسین، لووفلوکساسین که پس از تهیه و آماده سازی دیسک های آنتی بیوتیکی و تهیه کشت 24 ساعت از نمونه های جمع آوری شده تست آنتی بیوگرام انجام گرفت. برای این منظور از روش دیسک گذاری استفاده شد که با سوآپ به صورت کامل متراکم از نمونه های باکتری مورد نظر در محیط مولر هینتون آگار، کشت داده شد. پس از اتمام کشت، دیسک های مورد نظر را در کنار شعله با یک پنس استریل روی محیط کشت با فواصل مناسب از هم که قطر هاله ها در هم ادغام نشود، قرار داده شد. سپس پلیت ها به صورت وارونه در انکوباتور 37°C درجه به مدت 24 ساعت گرماگذاری شد. بعد از این زمان اندازه قطر هاله های عدم رشد در پلیت ها اندازه گیری گردید و با پروتکل استاندارد ۲۰۱۱ (Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines) مقایسه گردید. در نهایت مقاومت باکتری های *E.coli* جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک ها سنجیده شد.

۴- استخراج ژنوم باکتری: در این تحقیق ژنوم باکتری به وسیله کیت استخراج ژنوم MBST از درون سلول، استخراج و خالص سازی شدند. این کیت مخصوص استخراج ژنوم از سلول های پروکاریوت بوده و نکته مهم در مورد این کیت عدم نیاز به استخراج به وسیله فنول و کلروفرم و همچنین رسوب اتانل است. این روش یک راه

مقاوم	45 (64.28%)	45 (64.28%)	47 (67.14%)	45 (64.28%)	45 (64.28%)
حساس	13 (18.57%)	17 (24.28%)	15 (21.42%)	14 (20.0%)	14 (20.0%)
نیمه حساس	12 (17.14%)	8 (11.42%)	9 (12.85%)	11 (15.71%)	11 (15.71%)

۳- نتایج تشخیص حضور جهش‌ها در دو ژن *gyr A* و

par C با روش PCR و Sequencing. در نمونه‌های *E. coli* مقاوم نسبت به آنتی بیوتیک‌های خانواده فلوروکینولون‌ها (۴۵ نمونه از ۷۰ نمونه *E. coli* جدا شده)، قطعه‌های ویژه‌ای از دو ژن *gyr A* و *par C* که شامل نواحی خاص مقاوم نسبت به کینولون‌ها هستند (QRDR)، با پرایمرهای اختصاصی تکثیر داده شده و در روی ژل الکتروفورز با تشکیل باندهای مربوط به ناحیه تکثیر شده ۴۸۰ bp برای ژن *gyr A* و ناحیه تکثیر شده ۲۳۵ bp برای ژن *par C* مقابل مارکر مولکولی ۱۰۰ bp حضور این ژن‌ها در نمونه‌های مقاوم به داروهای فلوروکینولونی تأیید شد (حضور این ژن‌ها در ۴۳ نمونه از ۴۵ نمونه *E. coli* مقاوم به داروها مشاهده شد) در شکل‌های ۱ و ۲ نتایج مربوط به این موارد آورده شده است. سپس با تعیین توالی این نواحی، حضور ۵ جهش در ژن *gyr A* و ۲ جهش در ژن *par C* مشخص شد، که نتایج مربوط به حضور جهش‌ها و تعیین ترادف توالی‌ها در جدول ۵ و شک‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است.

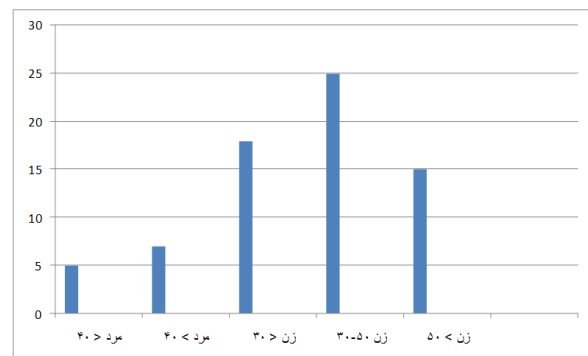


شکل ۱ - محصول PCR روی ژل الکتروفورز برای ژن *gyr A* در نمونه‌های مقاوم به فلوروکینولون‌ها.

خالص سازی همراه پرایمرهای ذکر شده در جدول ۱ برای تعیین توالی و بررسی حضور جهش‌ها در این نواحی، به شرکت سیناژن ارسال گردید.

یافته‌ها

۱- جدا سازی و شناسایی *E. coli*: در این تحقیق از ۱۰۰ نمونه ادراری بیماران مبتلا به عفونت ادراری، ۷۵ نفر (۷۵ درصد) زن با میانگین سنی ۳۵ سال و ۲۵ نفر (۲۵ درصد) مرد با میانگین سنی ۴۹ سال بودند. نتایج حاصل از کشت بر روی محیط‌های انتخابی و افتراقی نشان داد که از این تعداد ۷۰ نمونه (۷۰ درصد) از نظر *E. coli* مثبت بوده و ۳۰ نمونه (۳۰ درصد) از نظر کبسیلا مثبت بوده اند. در نمونه‌هایی که از نظر *E. coli* مثبت بودند، ۵۸ نفر (۸۲/۸۵ درصد) زن و ۱۲ نفر (۱۷/۱۴ درصد) مرد بودند (نمودار ۱).



نمودار ۱- تفکیک جنسی و سنی سویه های *E. coli* جدا شده در این

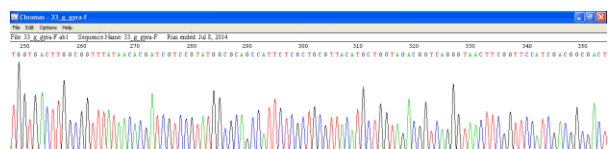
پژوهش

۲- بررسی مقاومت به آنتی بیوتیک‌های فلوروکینولون در آنتی بیوگرام: در این مطالعه با استفاده از روش دیسک گذاری برای آنتی بیوگرام میزان مقاومت ۷۰ نمونه *E. coli* نسبت به آنتی بیوتیک‌های خانواده فلوروکینولون‌ها نظیر سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، افلوکساسین، نورفلوکساسین و لووفلوکساسین سنجیده شد، که نتایج در جداول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴- نتایج آنتی بیوگرام برای *E. coli* -های/یزوله شده نسبت به هر یک از آنتی بیوتیک‌های فلوروکینولونی مورد مطالعه

آنتی بیوتیک	سیپروفلوک ساسین	نالیدیکسیک اسید	افلوکساسین	نورفلوکساسین	لووفلوکساسین
----------------	--------------------	--------------------	------------	--------------	--------------

C 248 T →



gyrA gene sequence for C 273 A and T 300 C →

241ATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAAC
ACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGC
300

C 273 A

T 300 C

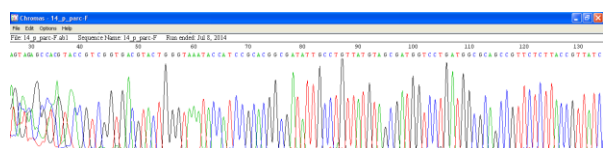
301TGC GTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
TAACTTCGGTTCATCGACGGCGACTCTGCG
G 360

شکل ۳- نتایج تعیین توالی قطعه ای بطول 480 bp از ژن *gyrA* برای بررسی حضور ۵ جهش در این ژن.

a- جهش های $T \leftarrow G$ در نوکلئوتید ۸۷ و $C \leftarrow T$ در نوکلئوتید ۱۰۷.

b- جهش $T \leftarrow C$ در نوکلئوتید ۲۴۸.

c- جهش های $A \leftarrow C$ در نوکلئوتید ۲۷۳ و $C \leftarrow T$ در نوکلئوتید ۳۰۰.

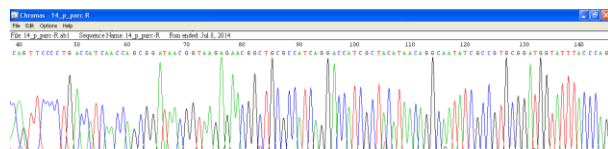


parC gene sequence for G 80 A →
ICCAAGCAAGATGTCCATTCTCGAGAGTAGA
GCCACGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAA
60

61ATACCATCCGCACGGCGATATTGCCTGTT
ATGTAGCGATGGTCTGATGGCGCAGCCGTT
120

G 80 A

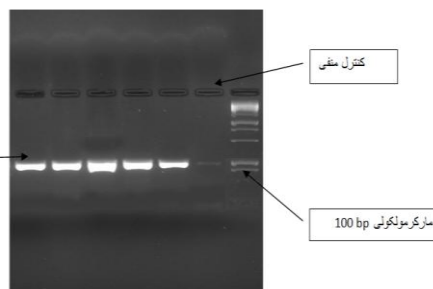
121CTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTC
AGGGGAACTGGGGGGCGCCGGACGATCCGA
A 180



parC gene sequence for C 84 T →
1GTACGTCTCCGATCTGTAATAACGATAAGC
GCGTGCACCAAGTCCCTGACCATCAACCA
60

61GCGGATAACGGTAAGAGAACGGCTGCGC
CATCAGGACCATCGCTACATAACAGGCAAT
AT 120

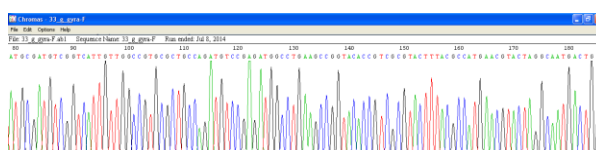
C 84 T →



شکل ۲- محصول PCR روی ژل الکتروفورز برای ژن *parC* در نمونه های مقاوم به فلوروکینولون ها.

جدول ۵- نتایج حضور جهش های دو ژن *parC* و *gyrA* در *E. coli* های مقاوم به فلوروکینولون ها

ژن	شماره کدن تغییر یافته	نوکلئوتید تغییر یافته	فراوانی %
<i>gyrA</i>	۸۷	$T \leftarrow G$	۶۷/۵
<i>gyrA</i>	۱۰۷	$C \leftarrow T$	۹۳
<i>gyrA</i>	۲۴۸	$T \leftarrow C$	۹۳
<i>gyrA</i>	۲۷۳	$A \leftarrow C$	۸۶
<i>gyrA</i>	۳۰۰	$C \leftarrow T$	۸۶
<i>parC</i>	۸۰	$A \leftarrow G$	۵۱/۲
<i>parC</i>	۸۴	$T \leftarrow C$	۵۱/۲



gyrA gene sequence for G 87 T and T 107 C →

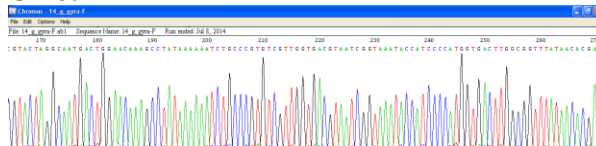
1GCGCTGGAAGATCTGCCTATGCGAGTGCTC
GTACACCGGTCAACATTGAGGAAGAGCTGA
60

61AGAGCTCCTATCTGGATTATGCGATGTCG
GTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGTCC
120

G 87 T

T 107 C

121GAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTCG
CGTACTTTACGCCATGAACGTACTAGGCAAT
G 180



gyrA gene sequence for C 248 T →

121ATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTCGCGT
ACTTTACGCCATGAACGTACTAGGCAATGAC
T 180

181GGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCG
TGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCAT
C 240

241CCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAACACG
ATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGC
300

121CGCCGTGCGGATGGTATTTACCCAGTAC
GTCACCGACGGTACGGGCGGATTTTTTAAAT
T 180

شکل ۴- نتایج تعیین توالی قطعه ایی به طول 235bp از ژن *par C* برای بررسی حضور دو جهش در این ژن.
a- جهش $A \leftarrow G$ در نوکلئوتید ۸۰ و b- جهش $T \leftarrow C$ در نوکلئوتید ۸۴

بحث

عفونت دستگاه ادراری (UTI) از مهم ترین عفونت های است که تاکنون شناخته شده است. *E.coli* یکی از عوامل ایجاد کننده عفونت ادراری در اغلب کشورهای دنیاست (۱۳). در رابطه با شناسایی باکتری *E.coli* بیش تر پژوهشگران از تست های بیوشیمیایی مربوط به این باکتری استفاده می کنند (۱).

در این تحقیق از ۱۰۰ نمونه جمع آوری شده، بعد از انجام آزمون های افتراقی ۷۰ نمونه (۷۰ درصد) مربوط به باکتری *E.coli* بود که این نشان دهنده شیوع بالای این باکتری و تأیید کننده نقش باکتری *E.coli* به عنوان عامل اصلی عفونت ادراری در بین مبتلایان است و تعداد ۳۰ نمونه مربوط به باکتری *کلبسیلا* بود که نسبت به باکتری *E.coli* سهم کمتری را به خود اختصاص داده است. از تمامی نمونه های *E.coli* جمع آوری شده نسبت به آنتی بیوتیک های خانواده فلوروکینولون ها تست آنتی بیوگرام انجام شد. در این مطالعه مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به پنج آنتی بیوتیک خانواده فلوروکینولون ها نظیر نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، لووفلوکساسین و نورفلوکساسین بررسی شد که از بین ۷۰ نمونه باکتری *E.coli* جمع آوری شده، ۴۵ نمونه معادل ۶۴/۲۸ درصد به آنتی بیوتیک های مذکور مقاومت نشان دادند که مشخص گر ایجاد مقاومت زیاد نسبت به این داروها می- باشد.

بروز مقاومت نسبت به درمان با آنتی بیوتیک ها، از مسائلی است که توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است. (۲۱) به دلیل وجود میزان بالای مقاومت *E.coli* به تری متوپریم-سولفامتوکسازول، فلوروکینولون ها به طور گسترده ای به عنوان درمان اولیه برای عفونت های ادراری تجویز می شوند. با این وجود، میزان فزاینده مقاومت *E.coli* به فلوروکینولون ها نگرانی های جدیدی را برانگیخته است (۲۲). آمار بالای مقاومت نسبت به این داروها در

کشورمان به علت مصرف بی رویه در مقایسه با نتایج بسیاری از کشورها قابل توجه می باشد و بنا بر مطالعه های انجام شده بین ۱۰ تا ۳۰ درصد بالاتر می باشد. با توجه به تحقیق های انجام گرفته، استفاده از فلوروکینولون ها برای درمان عفونت ادراری به ازای هر ۱۰۰۰ ویزیت بیمار، از ۳/۱ نسخه در سال ۱۹۹۸ به ۱۲/۷ نسخه در سال ۲۰۰۵ افزایش یافته و در همین دوره استفاده از سولفونامید از ۲۴ به ۱۱/۷ نسخه در هر ۱۰۰۰ ویزیت کاهش یافته است. میزان مقاومت *E.coli* جدا شده از عفونت ادراری به لووفلوکساسین در سال ۱۹۹۹ از ۱ درصد به ۹/۴ درصد در سال ۲۰۰۵ افزایش یافته است و در میان ۴۱ نمونه جدا شده *E.coli* مقاوم به لووفلوکساسین، ۹۰ درصد از موارد به آموکسی سیلین - کلاوولانات حساس باقی مانده اند (۲۲)، (۲۵). در تحقیقی که توسط ساتو و همکارانش در سال ۲۰۰۱ انجام شد، میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید ۶۳/۳ درصد بوده است که این داروها از ناکارآمدترین آنتی بیوتیک ها در درمان عفونت ادراری مطرح شدند (۲۹). در مطالعه ای که توسط کمت و همکارانش در سال ۲۰۱۰ صورت گرفت میزان مقاومت به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید و لووفلوکساسین ۷۳/۱۱ بوده است (۲۴). در مطالعه ای که توسط سانچز و همکارانش در سال ۲۰۱۰ به منظور بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی *E.coli* صورت گرفت، میزان مقاومت نسبت به نورفلوکساسین ۶۶/۶۴ درصد و نسبت به لووفلوکساسین ۶۵/۱۷ درصد گزارش شده است (۳۰). در مطالعه های مختلف، سرعت افزایش مقاومت بین ۳ تا ۱۰ درصد گزارش شده ولی تفاوت های زیادی در بین نتایج مطالعه های در مورد عفونت ادراری و سرعت مقاومت نسبت به فلوروکینولون ها به ویژه سیپروفلوکساسین (حتی تا ۲۰ درصد) عنوان شده است (۱۹، ۲۰). طبق تحقیق های کامپوز و کورنارد میزان مقاومت به نسبت به فلوروکینولون ها در بین ۸ سال از ۳ درصد به ۲۳ درصد افزایش یافته است (۶، ۷). راز و همکارانش درمان عفونت ادراری را با فلوروکینولون ها پیشنهاد کردند و مقاومت بر علیه آن ها را ۱۰ تا ۲۰ درصد گزارش نمودند (۲۸). گزارش های زیادی در مورد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های رایج مورد استفاده در درمان عفونت ادراری در ایران و سراسر دنیا وجود دارد (۵). در ایران نیز، تحقیق های انجام شده نشانگر این است که مقاومت به فلوروکینولون ها به ویژه نسبت به

سیپروفلوکساسین، در عفونت های ادراری ایجاد شده با باکتری *E.coli* در حال افزایش است (۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۲). بعد از انجام تست آنتی بیوگرام روی ۷۰ نمونه از باکتری *E.coli* به دست آمده از ادرار حدود ۴۵ نمونه (۶۴/۲۸٪) مقاومت بالایی را به تمام آنتی بیوتیک های فلوروکینولون-های مورد استفاده در این تحقیق نشان دادند. بنابراین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها بسیار شایع و در حال افزایش است و این امر باید جدی گرفته شود. به جزء دلایل قبلی که از عوامل مهم بروز مقاومت بودند دلایلی چون عدم درمان صحیح، خود درمانی، استفاده نادرست از آنتی بیوتیک ها و کامل نکردن دوره درمان نیز از دیگر عوامل هستند که می توانند پاسخ مناسبی به میزان بالای مقاومت گزارش شده در این تحقیق باشند. با توجه به شرایط بسیار سخت کشف آنتی بیوتیک های جدید که صرف هزینه های زیاد کشف، آزمایش های مختلف و صرف وقت طولانی است و از طرف دیگر با توجه به اثرهای جانبی استفاده از آنتی بیوتیک ها، بالا بردن دوز دارو راه حل مناسبی نیست. تنها و بهترین راه های پیش رو در مرحله اول پیش گیری از ابتلا با رعایت مسائل بهداشتی و در مرحله بعد استفاده صحیح از آنتی بیوتیک های رایج در صورت نیاز است. از سال ها قبل با توجه به استفاده بی رویه از انواع مختلف آنتی بیوتیک ها مقاومت به آن ها بروز پیدا کرده است. اما متأسفانه در سال های اخیر مقاومت چشم گیری نسبت به این آنتی بیوتیک ها دیده شده است، اما هم چنان بسیاری از پزشکان بدون انجام تست مهم آنتی بیوگرام در صورت ابتلا فرد به عفونت ادراری داروهای این خانواده و به طور گسترده سیپروفلوکساسین را تجویز می کنند. به هر حال مقاومت ها با دلایلی ژنتیکی از جمله موتاسیون خود به خودی یا انتقال افقی زیاد در حال بروز هستند. مکانیسم مقاومت در *E.coli* برای داروهای ضد میکروبی مختلف، متفاوت است. ولی مطالعه های اخیر نشان می دهد که این باکتری در بیش تر مواقع به اغلب آنتی بیوتیک ها مقاوم شده است. علت اصلی ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک های فلوروکینولونی جهش در ژن های کد کننده زیر واحدهای A و B، در دو آنزیم DNA ژیراز و توپوایزومراز IV است، بنابراین چنین نتیجه می شود که در باکتری *E.coli* این دو آنزیم هدف اصلی فلوروکینولون ها در اثر جهش می باشد (۴، ۲۷). از جمله عوامل مؤثر در مقاوم شدن باکتری *E.coli* به فلوروکینولون ها، بروز جهش

در ژن های کروموزومی و پلاسمیدی این باکتری می باشد که با حضور تغییرها در این ژن ها مقاومت نسبت به داروهای فلوروکینولونی ایجاد می گردد (۱۹، ۲۰). تحقیق حاضر مشخص نمود ارتباط معناداری بین حضور جهش در دو ژن *gyr A* و *par C* و ایجاد مقاومت به داروهای فلوروکینولونی در نمونه های آلوده به *E.coli* وجود دارد. در مطالعه ای که توسط حیدری و همکاران در سال ۱۳۹۴ انجام گرفته مشخص شده است که بین بیان ژن های پروتئین های غشایی که جذب فلوروکینولون ها را به داخل باکتری *E.coli* تسهیل می کنند و بروز جهش در ژن *gyr A* در سویه های *E.coli* مقاوم به سیپروفلوکساسین ارتباط معنا داری وجود دارد به طوری که مقاومت به دارو باعث افزایش بیان ژن های این پروتئین های غشایی می گردد (۱۸). همچنین در مطالعه انجام شده در سال ۱۳۹۳ توسط یوسفی و همکاران، بر روی ۳۰۹ نمونه ادراری آلوده به *E.coli*، ۱۳۹ نمونه مقاوم به سیپروفلوکساسین گزارش شده که در این نمونه ها بیش از ۷۰ درصد ژن پلاسمیدی مقاوم به فلوروکینولون ها حضور داشته است (۳۲). در تحقیق دیگری که در سال ۱۳۹۳ توسط حاکمی والا و همکارانش در ۱۰۰ نمونه های *E.coli* مقاوم به فلوروکینولون ها، جدا شده از ادرار بیماران بیمارستان امام خمینی تهران انجام گرفته است، ۷۷٪ به آموکسی کلاو، ۷۲٪ به سفتازیدیم، ۶۹٪ به سفوتاکسیم، ۶۳٪ به نالیدیکسیک اسید، ۵۱٪ به سیپروفلوکساسین، ۴۷٪ به سفکسیم، ۴۶٪ به سفتریاکسون، ۴۳٪ به سفالکسین مقاوم بوده اند که در بیش از ۳۹/۵٪ نمونه ها مقاومت به همراه حضور ژن های مقاوم به فلوروکینولون ها در باکتری، گزارش شده است (۱۶). مطالعه سلیمانی و همکاران که در سال ۱۳۹۲ روی عفونت های ادراری حاصل از باکتری *E.coli* مقاوم به کینولون ها انجام گرفته است مشخص نموده که ۸۲/۸٪ نمونه ها به نالیدیکسیک اسید و ۴۳٪ به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و این مقاومت با حضور ژن های پلاسمیدی مقاوم به دارو ارتباط داشته است (۳۱). بنابراین مقایسه مطالعه های نقاط مختلف جهان با ایران نشان داده است که در ایران نیز به همان سرعت دیگر نقاط جهان و گاهی سریع تر افزایش مقاوم شدن به داروها ایجاد شده است، که از علل آن می توان به مصرف بی رویه و زیاد و تجویز این آنتی بیوتیک ها به عنوان درمان علامتی و بی هدف، استفاده بیش از حد از آن ها برای پروفیلاکسی و در

دسترس بودن زیاد آن‌ها در بین بیماران اشاره نمود (۱۱)، ۲۶). سایر تحقیق‌های انجام شده در نقاط مختلف دنیا نیز بیان می‌کند بین مقاومت به داروهای فلوروکینولونی و حضور جهش در ژن‌های کد کننده دو آنزیم DNA ژیراز و توپوایزومراز IV در *E.coli* های ایجاد کننده عفونت‌های ادراری ارتباط وجود دارد. از جمله مطالعه کمت و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نشان داده است که سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید و لووفلوکساسین دارای جهش‌های در دو ژن *gyr A* و *par* بوده‌اند (۲۴). در تحقیق‌های به عمل آمده توسط زاوو و همکاران در سال ۲۰۰۵ در بررسی ۴ ژن *gyr B*، *gyr A*، *par C* و *par E*، نشان داده شده است که شیوع جهش در دو ژن *gyr A* و *par C* به ترتیب ۹۳ درصد و ۸۵ درصد بوده است (۳۳). در مطالعه که گیوود و همکارانش در سال ۲۰۰۱ بر روی جهش در ژن‌های *gyr A*، *gyr B*، *par C* و *par E* انجام شد مشخص گردید که هیچ‌گونه جهشی در دو ژن *gyr B* و *par E* رخ نداده و شیوع جهش در ژن‌های *gyr A* و *par C* حدود ۸۳/۳۳ درصد گزارش شده است (۱۲). در مطالعه کارلوسکی و همکاران در سال ۲۰۰۳ حدود ۹۸ درصد نمونه‌های *E.coli* مقاوم به سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید دارای جهش در دو ژن *gyr A* و *par C* بوده‌اند (۲۲). در مطالعه کرن و همکاران در سال ۲۰۰۰، ۸۵ درصد از سویه‌های *E.coli* مقاوم به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین دارای جهش در دو ژن *gyr A* و *par C* می‌باشند (۲۳). بنابراین مقایسه نتایج تحقیق‌های انجام شده در ایران و سایر نقاط جهان با مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ارتباط معنا داری بین حضور جهش در ژن‌های کروموزومی و پلاسمیدی باکتری *E.coli* به ویژه دو ژن کروموزومی *gyr A* و *par C* و پیدایش سویه‌های مقاوم به داروهای فلوروکینولونی در این باکتری وجود دارد.

نتیجه‌گیری

از مقایسه نتایج به دست آمده از این تحقیق با سایر پژوهش‌های انجام گرفته در این مورد چنین نتیجه می‌شود که هر سال بر تعداد گزارش‌های عفونت ادراری با عامل /شریشیکلی در سراسر جهان افزوده می‌شود و ممکن است در آینده‌ای نزدیک در جامعه ما و در کشورهای در حال توسعه مشکل‌های زیادی را به وجود بیاورد بنابراین با انجام

مطالعه‌های بیشتر و در جامعه آماری بزرگ‌تر و زمان بیشتر می‌توان در تکمیل تحقیق‌های اپیدمیولوژیک پرداخت و راه‌کارهای دقیق‌تری برای پیش‌گیری و درمان ارائه داد. همچنین با اطلاع از این که در هر منطقه جغرافیایی سویه و سروتیپ خاصی عامل بیماری می‌باشد، با مطالعه‌های منطقه‌ای در هر منطقه از ایران علاوه بر تکمیل اطلاعات در مورد سویه و باکتری شایع می‌توان در طراحی واکسن‌های بومی برای افراد ضعیف و در معرض خطر راه‌کارهایی ارائه نمود. با توجه به نتایج این تحقیق میزان مقاومت به داروهای آنتی بیوتیکی به ویژه داروهای معمول در درمان عفونت‌های رایج در جوامع، همچون عفونت ادراری ایجاد شده با میکروارگانیسم‌های پاتوژن رو به افزایش می‌باشد که در این ضمن مصرف بی رویه و تجویز غیر ضروری یا افزون بر میزان مورد نیاز و عدم رعایت دوز مجاز برای مصرف بیماران، در ایجاد سویه‌های مقاوم به دارو نقش اساسی دارد. به ویژه پیدایش سویه‌های مقاوم با ایجاد جهش در ژن‌های مقاومت به داروهای آنتی بیوتیکی در عوامل میکروبی ایجاد کننده عفونت‌ها، همراه است که علاوه بر ایجاد مشکل‌هایی در درمان این چنین عفونت‌هایی، بر بار اقتصادی و اجتماعی و فرهنگی جامعه نیز تأثیر گذار می‌باشد. بنابراین به عنوان یک امر ضروری در مسائل پزشکی جوامع باید به این موضوع‌های مهم پرداخته شود. همچنین با توجه به مقاومت بالای آنتی بیوتیکی به دست آمده در این تحقیق پیشنهاد می‌گردد جهت درمان عفونت ادراری با منشأ باکتری *E.coli*، قبل از تجویز هر نوع آنتی بیوتیک تست آنتی بیوگرام انجام گیرد و از تجویز بی رویه داروهای کینولونی پرهیز گردد زیرا که شیوع مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های خانواده فلوروکینولون‌ها مطابق با تحقیق‌های محققان در ایران و سایر مناطق جهان در حال پیشرفت می‌باشد و خطری جدی برای جامعه پزشکی و داروسازی به شمار می‌آید.

سپاسگزاری

از کلیه مسئولین محترم در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال به ویژه دانشکده علوم زیستی و آزمایشگاه دانشکده علوم زیستی (محمودیه) و مسئولین مراکز درمانی که در انجام کارهای آزمایشگاهی و تهیه نمونه‌های این تحقیق کمال همکاری و مساعدت لازم را مبذول فرموده‌اند، سپاسگزاری فراوان می‌گردد.

منابع

- 1-Aguiar JM, Chacon J, Canton R, Baquero F. The emergence of highly fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in community-acquired urinary tract infections. *J Antimicrob Chemo*, 1992; 29: 349-350.
- 2-Al-Agamy MHM, Hefny HM, Fouda SI, Mansy MSM, Ashour MSE. Studies on microbial infections of the urinary tract in diabetic patients. *Az J Microb*, 1999; 44: 107-121.
- 3-AL-Agamy MHM, Zaki S. Mechanisms of fluoroquinolones resistance in *Escherichia coli* isolates from Saudi Arabia. *African J Microb Res*, 2012; 6(1): 155-9.
- 4-Bagel S, Hüllen V, Wiedemann B, Heisig P. Impact of *gyrA* and *parC* mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agent Chemo*, 1999; 40: 868-75.
- 5-Cambau, E, Gutmann L. Mechanisms of resistance to quinolones. *Drug*, 1993; 45(3): 15-23.
- 6-Chapman JS, Georgopapdokou NH. Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agent Chemo*, 1988; 32: 438-442.
- 7- Conrad S, Oethinger M, Kaifel K, Klotz G, Marre R, Kern WV. *gyrA* mutations in high-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemo*, 1996; 38 : 443-5.
- 8- Dielubanza E.J, Schaeffer A.J. Urinary tract infections in women. *Med Clin North AM*, 2011; 95(1): 27-41.
- 9-Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV and the 4-quinolone. *Microb Molecul Bio Rev*, 1997; 61: 377-92.
- 10- El-Kholy A, Baseem H, Hall GS, Procop GW, Longworth DL. Antimicrobial resistance in Cairo, Egypt 1999-2000: a survey of five hospitals. *J Antimicrob Chemo*, 2003; 51: 625-30.
- 11-Farshad Sh, Ranjbar R, Anvarinejad M, Amin Shahidi M, Hosseini M. Emergence of Multi Drug Resistant Strains of *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infection. *Open Conf Proceed J*, 2010; 1: 192-6.
- 12- Giraud E, Leroy-Setrin S, Flaujac G, Cloeckert A, Dho-Moulin M, Chaslus-Dancla E. Characterization of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* O78:K80 isolated from turkey. *J Antimicrob Chemo*, 2001; 47: 341-3.
- 13-Gniadkowski M, Schneider I, Paluchna A, Iungwirth R, Mikiewicz B, Bauernfeind A. Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of new CTX-M-3 cefotaxime hydrolyzing β -lactamase that closely related to CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agent Chemo*, 1998; 42: 827-832.
- 14- Goettsch W, Chander R, Freudenien J. Increasing resistance to floquinolons in coliform UTI in Netherland. *J. Antimicrobial. Chemoter*, 2000; 46(2) : 226-8.
- 15- Grossman Z, Miron D. Imaging and follow-up of children with first febrile Urinary Tract Infection (UTI). *Harefuah*, 2009; 148(10): 716-20.
- 16-Hakemi Vala M, Abdi Sh, Ranjbar R, Bejestani Bagheri O ,Bejestani Bagheri F. qnr gene diversity of fluoroquinolone resistant *E.coli* isolated from patient's urin of Imam Khomani hospital. *Iranian J Infec Dis Trop Med*, 2014; 19(64): 63-6.
- 17-Hawkey PM. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J Antimicrob Chemo*, 2003; 51(1): 29-35.
- 18-Heidari F, Pourahmad R, Shareghi B. Expression of *ompF* gene in *E. coli* mutants resistant to ciprofloxacin and Tetracycline. *J Genetic Novin*, 2015; 10(1): 123-8.

- 19-Heisig P. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993; 40: 879-85.
- 20-Heisig P, Schedletzky H, Falkenstein-Paul H. Mutations in the *gyrA* gene of a highly fluoroquinolone-resistant clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agent Chemo*, 1993; 37: 696-701.
- 21-Jonas D, Biehler K, Hartung D, Spitzmuller B, Dashner FD. Plasmid mediated quinolone resistance in isolates obtained from German intensive care unites. *Antimicrob Agent Chemo*, 2005 49: 773-5.
- 22-Karlowksy JA, Thornsberry C, Jones ME, Sahm DF. Susceptibility of Antimicrobial-Resistant Urinary *Escherichia coli* Isolates to Fluoroquinolones and Nitrofurantoin . *Clin Infect Dis*, 2003; 36: 183-7.
- 23- Kern WV, Oethinger M, Jellen-Ritter AS, Levy SB. Non-target gene mutations in the development of fluoro-quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agent Chem*, 2000; 44: 814-20.
- 24- Kmet V, Kmetova M. High level of quinolone resistance in *Escherchia coli* from healthy chicken broiler. *Folia Microb*, 2010; 55(1): 79-82.
- 25-Kresken M, Wiedemann B. Development of resistance to nalidixic acid and the fluoroquinolones after the introduction of norfloxacin and ofloxacin. *Antimicrob Agent Chemo*, 1988; 32: 1285-8.
- 26-Mohajeri P, Izadi B, Rezai M, Falahi B, Khademi H, Ebrahimi R. [Assessment of the frequency of Extended Spectrum Beta Lactamases Producing *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections and its Antibiotic Resistance Pattern in Kermanshah]. *J Ardabil Univ Med Sci*, 2011; 11(1): 86-94.
- 27- Oram M, Fisher LM. 4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Agent Chemo*, 1991; 35: 387-9.
- 28-Ruiz J. mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Agent*, 2003; 46: 2656-61.
- 29- Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Lantero M, Ruiz-Larrea F, Torres C. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods, and humans in Spain. *Int J Antimicrob Agent*, 2001; 18: 353-8.
- 30-Sanchez GV, Master RN, Karlowksy JA, Bordon JM. Invitro antimicrobial resistance of urinary *Escherichia coli* isolates among U.S. outpatients from 2000 to 2010. *Antimicrob Agent Chemo*, 2012; 56(4): 2181-3.
- 31-Soleimani Asl Y, Zibaei M, Firoozeh F. Detection of *qnrA* gene among quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Khorram Abad during 2011-2012. *J Kashan Univ Med Sci*, 2013; 17(5): 488-94.
- 32- Yosofi S, Mojtahedi A, Shenaghari M, Atrkar Roshan Z. Association to qnr genes with ciprofloxacin resistant *E.coli*. *J Kordestan Univ Med Sci*, 2015; 20(5): 52-60.
- 33-Zhao S, Maurer J, Hubert J, De villena J, Mcdermott P. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Veter Microb*, 2005; 107: 215-24.