

شناسایی مولکولی ژن های مقاومت به انروفلوکساسین در اشریشیا کلی جدا شده از ماکیان گوشتی در تهران و تنکابن

پگاه کریمی^۱، مصطفی جعفرپور^{۲*}، علی ناظمی^۳

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۵ تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۲۶

چکیده

اشریشیا کلی یکی از شایع ترین عوامل بیماریزا در طیور می باشد که منجر به بیماری کلی باسیلوز می گردد. این بیماری مسئول ضرر و زیان اقتصادی برای تولید کنندگان مرغ در سراسر جهان می باشد. فلور کینولون ها به خصوص انروفلوکساسین که نسل دوم فلور کینولون ها می باشند به طور گسترده ای در مرغداری ها جهت درمان بیماری مورد استفاده قرار می گیرد. استفاده وسیع و بی رویه از فلور کینولون ها در صنعت طیور خطر ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی در بین اشریشیا کلی بیماریزا را افزایش می دهد. DNA ژیراز (توپوایزومراز II) و توپوایزومراز IV هدف اصلی فلور کینولون ها می باشد. جهش در ژن های کد کننده DNA ژیراز (gyrA, gyrB) و توپوایزومراز IV (parE, parC) علت اصلی مقاومت به فلور کینولون ها در اشریشیا کلی می باشد. هدف از این مطالعه شناسایی جهش های مرتبط با ژن های دخیل در مقاومت آنتی بیوتیکی به انروفلوکساسین می باشد. از ۸۰ جدایه E. coli، ۲۰ جدایه توسط روش دیسک دیفیوژن، مقاوم به انروفلوکساسین شناسایی شدند. سپس حضور جهش در ژن های gyrA, gyrB, parC, parE در آنها مورد بررسی قرار گرفت. جهش های S83→L, D87→N در gyrA, F514→S در gyrB, S80→I در parC مشاهده شد اما جهشی که منجر به تغییر در اسید آمینه شود در parE یافت نشد.

واژگان کلیدی: اشریشیا کلی، مقاومت آنتی بیوتیکی، انروفلوکساسین، DNA ژیراز

مقدمه

اشریشیا کلی یکی از شایع ترین عوامل بیماریزا در طیور به شمار می رود. اشریشیا کلی چه به صورت

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبی شناسی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، تنکابن، ایران
- ۲- استادیار، گروه آموزشی میکروبی شناسی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، تنکابن، ایران
- ۳- استادیار، گروه آموزشی ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، تنکابن، ایران

*- پست الکترونیکی نویسنده مسئول: S.jafarpour@tonekaboniu.ac.ir

اولیه و چه بصورت ثانویه در همراهی با بیماریهای دیگر یکی از مهم ترین عوامل ایجاد کننده بیماری در ماکیان و پستانداران است (۴ و ۲۴). این باکتری باعث بیماری های سیستمیک مانند کلی باسیلوز در طیور می شود که اصطلاحاً آن را Avian Pathogenic E.coli (APEC) می نامند (۱۹ و ۳۲ و ۳۷). بیماری کلی باسیلوز مسئول ضرر و زیان اقتصادی برای تولید کنندگان مرغ در سراسر جهان است (۱۱ و ۱). روده مکان مناسب برای انتشار این باکتری به محیط و انتقال از طریق مدفوع

A و B به ترتیب توسط parC و parE کد می‌شوند (۳۰). این دو آنزیم متعلق به خانواده توپوایزومراز II هستند (۱۵ و ۳۰) که با ایجاد شکاف در هر دو رشته‌ی DNA قادر به ایجاد سوپرکویل منفی می‌باشند (۴). این فعالیت برای همانند سازی DNA، رونویسی و نوترکیبی ضروری به نظر می‌رسند (۳۰). علت اصلی مقاومت به فلورکینولون‌ها در اشریشیا کلی، جهش در ژن‌های کد کننده زیر واحدهای A و B، DNA ژیرازو توپوایزومراز IV است. این دو آنزیم هدف اصلی فلورکینولون‌ها هستند (۷ و ۲۰ و ۲۷ و ۳۱). مهم‌ترین جهش‌ها، در ناحیه تعیین کننده مقاومت به کینولون‌ها (QRDR) در gyrA و ناحیه مشابه آن در ژن parC رخ می‌دهد (۱۳، ۱۵، ۲۵). این ناحیه، جایگاه فعالیت gyrA (Tyr-122) در DNA می‌باشد و کینولون با اتصال به این جایگاه از عمل آنزیم جلوگیری می‌کند (۴)، اگر چه جهش نیز در خارج از این نواحی گزارش شده است (۸). هدف از این مطالعه شناسایی جهش‌های مرتبط با ژنهای دخیل در مقاومت آنتی بیوتیکی به انروفلوکساسین می‌باشد.

مواد و روش کار

جداسازی باکتری: تعداد ۸۰ نمونه اشریشیا کلی از قلب، کبد، طحال و کیسه های هوایی از جوجه های گوشتی مبتلا به کلی باسیلوز در طی سال های ۱۳۹۰-۱۳۸۹ از آزمایشگاه‌های استان تهران و شهرستان تنکابن جمع‌آوری شدند و تحت شرایط استریل، نمونه‌ها در محیط کشت EMB و در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد

به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند سپس کلنی‌های دارای جلای فلزی توسط مجموعه آزمایشات بیوشیمیایی شناساگر خانواده انتروباکتریاسه آزمایش شدند. همه ی نمونه ها در محیط LB (Lurine Broth) در دمای ۸۰- درجه سلسیوس برای آنالیز های بعدی نگهداری شدند .

است (۱۲). استنشاق گرد و غبار آلوده به مدفوع منجر به عفونت های سیستمیک توسط APEC می‌شود (۱۹). توانایی جابه جایی اشریشیا کلی در مخاط دستگاه تنفسی و یا روده ای و انتشار سیستمیک آن، APEC را جزء اشریشیا کلی پاتوژن خارج روده‌ای (exTRA intestinal Patogenic E.coli) قرار داده است (۱۸). این سویه به واسطه حضور ژن های حدت که آنها را قادر به زندگی خارج روده‌ای می‌سازد شناخته می‌شوند. حضور این باکتری به دنبال عوامل اولیه مانند عفونت‌های ویروسی (نیوکاسل) و مایکوپلازما تشدید می‌یابد و زمینه ساز بیماری‌هایی مانند سپتی سمی، بیماری‌های تنفسی مزمن، عفونت کیسه زرده، التهاب صفاق، عفونت مزمن پوستی، استئومیلیت و سندرم آماس سر است (۱۱ و ۱۷ و ۲۴). درمان آنتی بیوتیکی نقش مهمی در جلوگیری از انتشار بیماری و کاهش مرگ و میر حاصل از آن ایفا می‌کند (۲۷ و ۳۳). انروفلوکسا سین نسل دوم فلورکینولون‌ها است که به طور گسترده‌ای در مرغداری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۸). فلور کینولون‌ها مشتقات کینولون‌ها هستند که با قرار دادن اتم فلوئور در موقعیت ۶ به وجود می‌آیند که سمیت پایین و طیف اثر وسیعی دارند (۳ و ۲۳ و ۳۶). استفاده وسیع از فلورکینولون‌ها در دامپزشکی، خطر ایجاد مقاومت در بین اورگانیزم های بیماری زا را افزایش می‌دهد (۲۸). فلورکینولون‌ها به طور مستقیم سنتز DNA را مهار می‌کنند این مهار از طریق اثر متقابل دارو بر روی کمپلکس DNA-آنزیم (DNA ژیراز یا توپرایزومراز IV) صورت می‌گیرد و فعالیت آنزیمی مختل گشته در نتیجه همانند سازی متوقف شده و سلول می‌میرد (۵ و ۱۴ و ۲۸). آنزیم DNA ژیرازو توپوایزومراز IV ارتباط ساختمانی با یکدیگر دارند (۱۵). هر دوی آنها تترا مرهایی با دو جفت زیر واحد می‌باشند. DNA ژیراز دارای دو زیر واحد A و B است که به ترتیب توسط ژن های gyrA , gyrB کد می‌شوند (۶ و ۲۹). و در توپرایزومراز IV زیر واحدهای

جدول ۲- پرایمر های واکنش Singl PCR

Primer	Sequence(5'-3')	Size ,bp
gyrA	TACACCGGTCAACATTGAGG TTAATGATTGCCCGCCGTCGG	648
gyrB	GCGCGTGAGATGACCCGCCGT CTGGCGGTAGAAGAAGGTCAG	448
parC	AAACCTGTTCAGCGCCGCATT GTGGTGCCGTTAAGCAAA	395
parE	CTGAACTGCTGGCGGAGATG GCGGTGGCAGTGCGACGTAA	483

جدول ۳- برنامه PCR جهت تکثیر gyrA , gyrB , parC , parE

Gene	Cycling condition
gyrA	95°C for 4 min, followed by 35 cycles of 95°C for 30 sec, 64°C for 1 min, 74°C for 2.30 min, and 74°C for 5 min final extension
gyrB	95°C for 4 min, followed by 35 cycles of 95°C for 40 sec, 63.5°C for 40 sec, 72°C for 1 min, and 72°C for 5 min final extension
parC	95°C for 4 min, followed by 35 cycles of 95°C for 40 sec, 61°C for 40 sec, 72°C for 40 sec, and 72°C for 5 min final extension
parE	95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 95°C for 40 sec, 61°C for 1 min, 72°C for 1 min, and 72°C for 5 min final extension

نتایج

از ۸۰ جدایه اشریشیاکلی که توسط تست های بیوشیمیایی شناساگر خانواده انتروباکتریاسه در دو منطقه تنکابن و تهران شناسایی شدند، ۲۰ جدایه از دو منطقه، هر کدام ۱۰ جدایه، توسط روش کربی بایر، مقاومت آنها به انروفلوکسازین مشخص گردید. قطعات ژنتیکی کد کننده gyrA (648bp), gyrB (448bp), parC (395bp), parE (483bp), که در برگیرنده نواحی QRDR (Determining Region) هستند تکثیر گردیدند. شکل (۱) نتایج تکثیر PCR را نشان می دهد.

- تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی: مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها به انروفلوکسازین توسط روش دیسک دیفوزن تعیین شدند (۱۸). نتایج بعد از ۲۴h انکوبه در دمای ۳۷۰c طبق استاندارد NCCLS بررسی شدند. (۳۹)

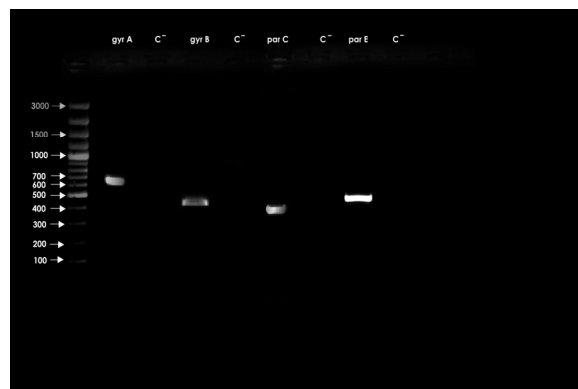
- استخراج DNA : DNA جدایه ها به روش Boiling استخراج شدند (۲).

- انجام PCR و تعیین توالی ژن ها: PCR مخلوطی به حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش برای هر ژن در جدول (۱) ارائه شده است. مخلوط واکنش را در یک میکروتیوپ تمیز ریخته و به مدت ۳۰s ورتکس کرده و ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده به مخلوط اضافه کرده و در دستگاه ترموسایکر، PCR تحت شرایط چرخه ای که در جدول (۳) ارائه شده انجام گردید. محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. جهت تعیین توالی ژن های مورد نظر، محصولات PCR، به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید. پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق در جدول (۲) ارائه شده است. جهش های رخ داده در ژن های مورد نظر به وسیله نرم افزار های Genrunner و Chromas در مقایسه با ژن های مشابه در سویه حساس E.coli K-12 تجزیه و تحلیل گردیدند.

جدول ۱- مخلوط واکنش هر ژن برای انجام PCR

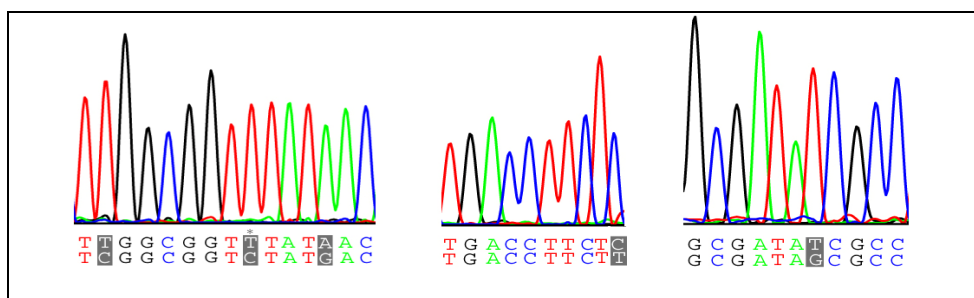
parC, parE	gyrB	gyrA	مخلوط واکنش در حجم ۵۰µl
۳۷	۳۹/۳	۳۶/۵	dH2o
۵	۵	۵	10xbuffer
۱	۰/۵	۱/۵	Mgcl2(50mm)
۱	۰/۵	۱	dNTP(10mm)
۱	۰/۷	۱	Primer mix (10 pmd)
۵	۴	۵	Template
۰/۵	۰/۵	۰/۵	Taq

تغییر در توالی اسید آمینه می‌شود. جهش‌های خاموش به ویژه در ژن *parE* مشاهده شد. همه‌ی جدایه‌ها دارای جهش‌های S83→L در *gyrA* بودند. ۱۸ جدایه با دو جهش S83→L و D87→N, S83→L و ۲ جدایه با جهش S83→L در *gyrA* یافت شدند. در ۲ جدایه جهش‌های F514→S در *gyrB* مشاهده شد. ۱۸ جدایه دارای جهش‌های S83→L, D87→N, S83→L در *gyrA* و S80→I در *parC* بودند. جهش‌های S83→L در *gyrA* در ۲ جدایه مشاهده شد. تمام ۱۰ نمونه مورد بررسی در شهر تنکابن و ۸ نمونه از ۱۰ نمونه مورد بررسی در تهران دارای جهش‌های S80→I در *parC* و D87→N, S83→L در *gyrA* بودند. ۲ نمونه از ۱۰ نمونه مورد بررسی در تهران دارای جهش S83→L در *gyrA*, F514→S در *gyrB* بودند. جهشی که منجر به تغییر اسید آمینه شود در *parE* یافت نشد. نوکلوتیدهای تغییر یافته در شکل (2) نشان داده شده است.



شکل ۱- نتایج تکثیر ژن های *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*

سپس محصول PCR ژن‌های مورد نظر با استفاده از پرایمر forward توالی یابی شدند. نهایتاً توالی این ژن (*gyrA* و *gyrB* و *parC* و *parE*) با توالی‌های ژن‌های مشابه در اشرشیا کلی سویه K-12 (Wild type) در سایت NCBI مورد سنجش و مقایسه قرار گرفتند. طبق بررسی‌های صورت گرفته در این مطالعه، جهش‌های مشاهده شده، منجر به جابجایی نوکلئوتیدها گردیده، بنابراین تغییر در توالی نوکلئوتیدی ژن، موجب



gyrA

gyrB

parC

شکل ۲- توالی حاصل از محصول PCR موتانت‌های مقاوم به انروفلوکساسین با استفاده از پرایمر Forward در بالای هر شکل اولین و دومین توالی نوکلئوتیدی به ترتیب به موتانت و (wild type) k-12 دارد. # جهش رخ داده منجر به تغییر در توالی اسید آمینه نشده است.

جدول ۴- انواع جهش‌ها در ژن های *parE*, *parC*, *gyrB*, *gyrA*

جهشی در <i>parE</i> یافت نشد				تعداد جدایه‌ها		تعداد از کل (n=20)
<i>parE</i>	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	تهران	تنکابن	
83	87	514	80	8	10	18
L	N N		I	2		2
L		S				
k-12	S D	F	S			

F: Phenyl alanin , I: Isoleucine, N:Asparagin , D: Aspartic ,S: serine, L: Leucine

بحث

اشریشیا کلی یکی از شایع ترین عوامل بیماری‌زا در طیور بشمار می‌رود (۲۴،۴). حضور این باکتری به دنبال عوامل اولیه مانند عفونت‌های ویروسی (نیوکاسل) و مایکوپلاسما تشدید می‌شود و زمینه ساز بیماری‌هایی مانند سپتی سمی، بیماری‌های تنفسی مزمن، عفونت کیسه زرده، التهاب صفاق، عفونت مزمن پوستی، استئومیلیت و سندرم آماس سر گردد (۲۴،۱۷،۱۱). بیماری ایجاد شده توسط اشریشیا کلی باعث ضرر و زیان فراوانی می‌گردد (۱۱،۱). استفاده از آنتی بیوتیک‌ها خصوصا انروفلوکساسین (نسل دوم فلورکینولون‌ها) نقش مهمی در پیشگیری و درمان بیماری‌های ایجاد شده ایفا می‌کند (۲۸). اخیرا به دلیل استفاده بی رویه دارو در کشور ایران خطر مقاومت به انروفلوکساسین افزایش یافته است. علت اصلی مقاومت به فلورکینولون (انروفلوکساسین) در اشریشیا کلی، جهش در ژن‌های کد کننده زیر واحدهای DNA ژیراز و توپوایزومراز IV می‌باشد (۲۰). مهم ترین جهش‌ها در ناحیه تعیین کننده مقاومت به کینولون (QRDR) در gyrA و ناحیه مشابه آن در ژن parC رخ می‌دهد (۲۵،۱۳ و ۲۷). این ناحیه، جایگاه فعالیت gyrA (Tyr-122) در DNA می‌باشد و کینولون با اتصال به این جایگاه از عمل آنزیم جلوگیری می‌کند (۴). اگر چه در خارج از این نواحی نیز جهش گزارش شده است (۸). در تحقیقات به عمل آمده KMET و همکاران (۲۰۱۰) در خصوص جهش‌های رخ داده در gyrA و parC نشان داده شده که جدایه‌های مقاوم به نالیدیکسیک اسید با سطح بالای MIC برای سیپروفلوکساسین و انروفلوکساسین دارای جهش در کدون های ۸۳ و ۸۷ در gyrA و ۸۰ در parC بوده‌اند و در همه‌ی جدایه‌ها جهش در gyrA رخ داده است (۲۲). نتایج مشابهی توسط Kim و همکاران (۲۰۰۷) و همچنین Ozawa و همکاران (۲۰۰۸) بدست آمده است. اگر چه در مطالعات Ozawa و همکاران جهش دیگری در کدون ۸۷ علاوه بر کدون ۸۳ در

parC یافت شده است. همچنین مطالعات مشابهی توسط white و همکاران (۲۰۰۰) انجام شده و نتایج مشابهی بدست آمده اما تنها تفاوت آن در خصوص جایگاه جهش در parC بوده است که در کدون ۸۵ رخ داده است (۳۴). در تحقیقات به عمل آمده Zhao و همکاران (۲۰۰۵)، در خصوص بررسی جهش در ژن gyrA و gyrB و parC و parE نشان داده شده است که جهش در سه ژن gyrA و gyrB و parC رخ داده است. جهش در gyrA بر روی کدون‌های ۸۳ و ۸۷، در gyrB بر روی کدون‌های ۴۲۶ و ۴۶۶ و در parC در کدون ۸۰ بوده است و جهشی در parE یافت نشده است (۳۸). در مطالعه‌ای که Givaud و همکاران (۲۰۰۱) بر روی جایگاه جهش در این ژن انجام داده بودند در gyrB و parE جهشی مشاهده نشده بود و جایگاه جهش در gyrA و parC همانند سایر مطالعات گزارش شده است (۹). اگر چه در تحقیقات مشابهی که در ۲۰۰۴ توسط Yang و همکاران صورت گرفته است در ژن parE جهش رخ داده اما در gyrB جهشی یافت نشده است (۳۵). در مطالعه حاضر جهش‌های D87→N (در ۱۸ جدایه) و S83→L (در همه جدایه‌ها) در gyrA و جهش S80→I (در ۱۸ جدایه) در parC رخ داده است. جهش در gyrA در همه‌ی جدایه‌ها یافت شده است. این نتایج با نتایج سایر مطالعات مطابقت دارد (۳۸،۲۱،۲۲،۹) اگر چه در بعضی مطالعات جهش‌های متفاوتی با مطالعه‌ی حاضر در parC یافت شده است (۳۴،۲۶) در مطالعه حاضر جهش‌های F514→S در gyrB (۲ جدایه) رخ داده است. در این مطالعه جهش در ژن‌های gyrA و gyrB و parC رخ داده اما در ParE جهشی که منجر به تغییر در اسیدآمینه شود دیده نشده است که با نتایج مطالعه Zhao و همکاران مطابقت دارد. مطالعه‌ی حاضر نشان می‌داد که ۹۰٪ جدایه‌ها دارای جهش D87→N، S83→L در gyrA و S80→I در ParC و ۱۰٪ جدایه‌ها با جهش F514→S در gyrB و S83→L در gyrA بودند.

منابع

- 1- Ambile de, ComposT. Stehling, EG. Ferreira, A., Pestana de Castro,A.F., Brocchi, M. , Dias da Silvera, W., (2005): Adhesion properties, fimbrial expression and PCR detection of adgesin- related gene of avian *Escherichia coli* strain. Veterinary Microbiology. 106:275 -285.
- 2- Angulo, F.J., Johnson,K.R. , Tauxe, R.V., Cohen, M.L., (2000) :Origins and consequences of antimicrobial resistant nontyphoidal salmonella: Implications for the use of fluoroquinolones in food animals . Microbiology Drug Resistance. 6:77-83.
- 3- Apun,K.,Kho,K.L.,Chong,Y.L.,Hashimatol, F.H.,Abdullah,M.T.,Rahman,M.A.,Lesley,M.B.,Samuel,I.,(2011):Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in wildlife from disturbed habitats in Sarawak, Malaysia. Research Journal of Microbiology.6 (2):132-139.
- 4- Barnard, F.m., Maxwell, A., (2001): Interaction Between DNA gyrase and quinolones: effects of alanine mutations at GyrA subunit residues ser83 and Asp87. Antimicrob Agents Chemother .45:1994-2000
- 5- Chen, C.R., Malik, m., Sngder, M., Drlica , M., (1996) : DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome : quinolone –induced DNA cleavage . J.Mol. Biol. 258:627-637.
- 6- Drlica , K., Xilin , Z., (1997) : DNA gyase topoisomerase IV and the 4- quinolones . Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67:377-392.
- 7- Everett,M.J.,Fang, J.Y.,Ricci,V.,Pidcock,L.J.V.,(1996):Contribution of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals.J Antimicrobial Agent Chemoter.40:2380-86.
- 8- Friedman, S., Lu, T., Drlica, K., (2001): Mutation in the DNA gyrase a gene of *Escherichia coli* that expands the quinolone resistance – determining region Antimicrob. Agents Chemother. 45:2378-2380.
- 9- Givaud,E.,LeroySetrin,S.,Flaujac,G.,Cloeck aert,A.,DhoMoulin,M.,ChaslusDancla,E.,(2001): Characterization of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* O78:K80 isolated from turkeys.Journal of Antimicrobial Chemotherapy.47:341-343.
- 10- Goren, E., (1990): Colibacillose bij pluimvee: etiologie, pathologie en therapie . P;umivee Symposium. Upjohn Nederland, Doorn, the Netherlands.
- 11- Gukwon ,S. , Chase, Y. , choi, J. E. , Kim, B., jongsong, H. , KwanJang, H., (2008) :Epidemiological Prevelence of Avian Pathogenic*Echerichia coli* Differentated by Multiplex PCR from commercialchickens and Hatchery in korea. Jurnal of Bacteriology and Virulogy. 38:179-188.
- 12- Harry, E.G. (1964): The Survival of *Escherichia coli* in the dust of poultry houses. The Veterinary Record. 76: 466-470.
- 13- Heising,P.,(1996):Genetic evidence for a role of parC mutations in development of highlevel fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. J Antimicrobial Agent Chemoter.40:879-85.
- 14- Hiasa, H., Yousef, D.O., Marians, and K.J., (1996): DNA strand cleavage is required for replication fork arrest by a frozen topoisomerase – quinolone – DNA ternary complex. J.Biol . Chem . 271:26424-26429.
- 15- Hooper,D.V.,(2001):Emerging Mechanisms of fluoroquinolone resistance. Emerging Infection Diseases.7, 2.
- 16- JamesBoyle, V., Fancher, M., Ross,R.,(1972): Rapid,modifiedKirby- bauer susceptibility test with single,high-concentration antimicrobiadisks. Antimicrobialmothera Agents and Chemotherapy.3:418-424.
- 17- Janben, T., Philipp, H.C., Voss, M., preisinger, R., Wieler, L.H.,(2003):Maltiplex PCR is the first technique to allow the specific andsensitive detection of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), Nature Genetic.

- 18- Johnson , T.J ., Kariyawasam , S., Wannemuehler , Y., Mangiamele , P., Johnson , S.J., Nolan , L.K., (2007a) . The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli*. Strain O1:K1:H7 Sharas strong similarities with human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* genomes .Journal of bacteriology.189; 3228-3226.
- 19- Jordan,F.T.W., Williams, N.J., Wattret, A.,Jones,T.,(2005): Observations on salpingitis, peritonitis and salpingoperitonitis in a layer breeder flock. The Veterinary Record.157:573-577
- 20- Karami, A., Naghavi. K. H., Sorouri,R., Khalilpour,A., (2008): Use of MAMA-PCR to detect gyrA Mutation in Nalidixic Acid resistant clinical isolates of *Escherichia coli* .Iranian Journal Publ Health.37,1:42-47.
- 21- Kim,T.E., Jeong,Y.W., Cho,S.H., Kim,S.J., Kwon,H.J.,(2007): Chronological study of antibiotic resistances and their relevant genes in korean avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. Journal Clinical Microbiology. 45(10): 3309–3315.
- 22- Kmet, V., Kmetova, M., (2010): High level of quinolone resistance in *Escherichia coli* from healthy broiler.Folia Microbiol. 55(1): 79-82.
- 23- Livermore, D.M., James, D., Reacher, M., Graham, C., Nichols, T., Stephens, P., Johnson, A.P., George, R.C., (2002): Trends in fluoroquinolone (ciprofloxacin) resistance in Enterobacteriaceae from bacteremias, England and Wales, 1990-1999. Emergency. Infection. Disease. 8:473-478.
- 24- Mainil, J., university of leiye, Belgium, 2003, Avian pathogenic *Escherichia coli*. Veterinary Research. 30 (2-3) , P:299-316
- 25- Oram, M., Fisher, L. M., (1991): 4-quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. J Antimicrobial Agent Chemotherapy. 35: 387-89
- 26- Ozawa,M., Harada,K., Kojima,A., Asai,T., Sameshima,T.,(2008):Antimicrobial susceptibilities, serogroups, and molecular characterization of avian. Avian Diseases.52 (3):392-397.
- 27- Piddock, L. J. V., (1999): Mechanisms of fluoroquinolone resistance:an update 1994-1998.Drugs.58:11-8.
- 28- -Pourahmad Jaktaji,R., Mohiti,E., (2010):Study of mutations in the DNA gyrase gyrA Gene of *Escherichia coli*.Iranian Journal of Pharmaceutical. 9,1; 43-48.
- 29- Reece, R., Maxwewell, A., (1991): DNA structure and Function. Crit . Rev. Biachem . Molocular. Biology. 26:335-375
- 30- Ruiz, J., (2003): Mechonisms of resistance to quinolones : target alteration , decreased accumulation and DNA gyrase protection . J Antimicrob Chemother. 51:1109-1117.
- 31- Vila, J., Ruiz, J., Goni,P.,Jimenez, A., (1996): Detection of mutations in parC in quinolone- resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. J Antimicrobial Agent Chemotherapy. 40:491-93.
- 32- Vandekerchove,D.,De Herdet,P.,Laevans,H.,Pasmans,F.,(2004):colibacillosis in caged layer hens: characteristics of the disease and the aetiological agent. Avian pathology.33:117-125.
- 33- Watts, J. L., Salmon, S.A., Yancey, R.J., Nersessian, B., Kounev, and Z.V., (1993): Minimum inhibitory concentrations of bacteria isolated from septicemia and airsacculitis in ducks. Journal of Veterinary, Diagen. Investigation. 5: 625-628.
- 34- White, D., Piddock,L., Maurer,J., Zhao,S., Ricci,V., Thayer,S.,(2000): Characterization of fluoroquinolone resistance among veterinary isolates of avian *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 44(10): 2897–2899.
- 35- Yang,H., Chen,S., White,D., Zhao,S., McDermott,P., Walker,R., Meng,J.,(2004): Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in china. J Clin Microbiol.42 (8):3483-3489.

- 36- Zahraei Salehi, T., Farashi Bonab, S., (2006): Antibiotic Susceptibility of *Escherichia coli* Strains Isolated from Chickens with Colisepticemia in Tabriz P rovince, Iran. International Journal of Pultry Science. 5,7:677-648.
- 37- Zanella, A., Alboralia. G.L., Bardotti, M., Candotti, P., Martino, P.A., Stonfer, M., (2000): Severe *Escherichia coli* O111 septicaemia and polyserositis in hens at the start of lay. Avian pathology. 29: 311-317.
- 38- Zhao, S., Maurer, J., Hubert, J., De villena, J., Mcdermott, P., (2005): Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. Veterinary Microbiology. 107:215-224
- 39- Performance standards for antimicrobial susceptibility tests, (2003): NCCLS Vol. 23 No1