Iranian Journal of Medical Microbiology | ISSN:2345-4342

Evaluation of Antibiotic Resistance and Biofilm Formation Ability Uropathogenic E. coli (UPEC) Isolated from Pregnant Women in Karaj

Maryam Nikzad[1], Reza Mirnejad[2], Ebrahim Babapour[3*]

1. *Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran*
2. *Molecular Biology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
3. *Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran*

10.30699/ijmm.15.2.195

ABSTRACT

Background and Aim: Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) are the most common cause of urinary tract infections. The binding of these bacteria to epithelial cells and the formation of biofilms cause these bacteria to be further colonized and difficult to remove in the urinary tract. This study aimed to determine the antibiotic resistance and to evaluate the biofilm formation power in *Escherichia coli* isolated from pregnant women in the city of Karaj, Iran.

Materials and Methods: This descriptive-analytical study was performed on 64 isolates of UPEC. Identification of these bacteria was determined using biochemical tests and antibiotic resistance by Kirby – Bauer method and according to the recommendation of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2017) guideline. The ability to form biofilms, using the microtiter plate method and the presence of *pap*C and *sfa* genes was examined by Duplex PCR.

Results: Based on the results; the highest levels of resistance were related to cotrimoxazole (40.6%), and ampicillin (31.3%). The examination of biofilm formation by the phenotypic method also showed that of the isolates, 48.4% (strongly), 15.6% (moderately) and 21.8% (weakly) have biofilm formation power. Based on the obtained Duplex PCR results, 15 isolates had *pap*C gene, 10 isolates had *sfa* gene and 9 isolates had both genes simultaneously. 100% of the isolates with both *pap*C and *sfa* genes were able to produce biofilms.

Conclusion: The results showed that most UPEC causing urinary tract infections can form biofilms. Also, the abundance of *pap*C and *sfa* genes encoding pili in these strains can act as one of the binding factors of this bacterium.

Keywords: *Antibiotic resistance, Biofilm formation, Duplex PCR, Uropathogenic Escherichia coli (UPEC)*

Received: 2020/11/16; **Accepted**: 2021/02/08; **Published Online:** 2021/04/09

Corresponding Information: **Ebrahim Babapour, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran**
Email: e.babapour@kiau.ac.ir

Copyright © 2021, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online

Nikzad M, Mirnejad R, Babapour E. Evaluation of Antibiotic Resistance and Biofilm Formation Ability Uropathogenic E. coli (UPEC) Isolated From Pregnant Women in Karaj. Iran J Med Microbiol. 2021; 15 (2) :195-211

Download citation: BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks

Send citation to: Mendeley Zotero RefWorks

Introduction

Escherichia coli is the most common cause of urinary tract infections (UTI) in humans. Ecological status, ability to epithelial cell attachment, urinary lavage resistance, and biofilm formation are among the factors that make uropathogenic *E. coli* (UPEC) the leading cause of UTI in humans. This bacterium is an extremely diverse species that can colonize and persist in countless niches in animals, humans, and the environment **(1)**. Some strains of *E. coli* can be distinguished from their common strains and cause more natural pathogenesis in the gastrointestinal tract, tissues, and other host organs. The diarrhea-

causing *E. coli* are widely classified as extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPECs) **(2)**. ExPECs strains are associated with human urinary tract infections. UPEC strains act as intracellular opportunistic pathogens and are superior to host sensitivity and behavior by using different virulence factors for colonization in the urinary tract **(1, 2, 3)**. UPEC strains can colonize the urinary tract and bladder and cause inflammation of the bladder, as well as the ureter and kidneys causing pyelonephritis. Cell surface molecules and various structures involved in biofilm formation of UPEC **(3)**. Biofilms are a collection of microbial cells that are irreversibly surface-dependent and are not destroyed by gentle washing **(4)**. Besides, the tendency of planktonic cells to reach the surface of the mature biofilm causes phenotypic changes that have major consequences such as increased resistance to antimicrobial agents and resistance to host defense **(5)**. More than 50% of all reported bacterial infections make up the biofilm. Biofilm growth of pathogenic bacteria often leads to infections that increase antibiotic tolerance and host immune responses **(6)**. Bacterial attachment to uroepithelial cells allows the bacterium to resist the function of emptying the bladder and activating the message pathways in the host. Therefore, the attachment of bacteria to uroepithelial cells is an important step in the onset and spread of urinary tract infections, because unlike other bacteria, these bacteria do not wash out quickly **(7)**. This binding occurs through one of the bacterial adhesion's called P-fimbriae, which is encoded by the *pap* or pyelonephritis associated pili gene **(7)**. P-fimbriae is involved in bacterial colonization of the upper urinary tract, attachment to the renal vascular endothelium, and ultimately pyelonephritis **(7)**. Another important adhesin factor in this regard is S-fimbriae, which is encoded by the *sfa* or S-fimbrial adhesion gene. The above genes are of the mannose-resistant adenosine type and are located on an area of the chromosome called the Pathogenicity Islands **(8)**. The *pap* and *sfa* genes are the most common genes encoding pili in *E. coli* isolated from UTI that can help bacterial attachment to the host tissues and form antibiotic-resistant biofilms. Identification of biofilm-producing UPEC strains is important to better understand the pathogenicity and antibiotic resistance of this bacterium in UTI **(9)**. On the other hand, determining the antibiotic resistance pattern of *E. coli* causing UTI in the country, to identify drugs effective in the initial treatment of UTI and emerging resistance, can be very effective in controlling the disease. Therefore, this study aimed to determine the antibiotic resistance pattern of *E. coli* causing UTI, evaluate the biofilm formation using the microtiter plate method, and investigate *pap*C and *sfa* fimbriae genes using the Duplex PCR method.

Materials and Methods

Collection, Isolation, and Identification

In this descriptive-analytical study, during 3 months (from February to May 2017), 100 urine samples from pregnant women suspected of UTI were collected from comprehensive health centers in Karaj, Iran. To isolate *E. coli* and ensure the purity of the samples, each sample was cultured on McConkey agar and nutrient agar medium, and the presence of *E. coli* was confirmed by routine microscopic and biochemical tests.

Determination of Antibiotic Susceptibility by Disk Diffusion Method

Kirby-Bauer disk diffusion method was performed to determine the antibiotic susceptibility of *E. coli* isolates against six different antibiotic classes in Mueller-Hinton agar (Merck, Germany) according to the CLSI recommendations (2017). The antibiotic disks included ampicillin (AM, 10µg), cotrimoxazole (SXT, 25µg), ciprofloxacin (CP, 5µg), gentamicin (GM, 10µg), nitrofurantoin (FM, 300µg), and amikacin (AN, 30µg) (Padtan Teb Co, Iran). Reference strains of *E. coli* ATCC 25922 were used as quality control of the antibiotic disks **(10)**.

Evaluation of Biofilm Formation in UPEC by Microtiter Plate Method

In this method, a 24-hour culture of bacteria in Luria Bertani (LB) liquid medium was dilute as 0.5 McFarland turbidity and pour 10 µL into 990 µL of sterile LB medium to prepare a 1% dilution and then 200 µL was added to three cavities of the plate. After 24 hours of incubation at 37°C, first, it was washed with saline phosphate buffer three times at pH 7.3 to remove the bacteria that are not connected to the plate wall. It is then fixed with 250 µL of pure methanol for 15 minutes. Then, 200 µL crystal violet staining 2% was added and after 5 minutes, it was washed with phosphate-buffered saline. After that, 160 µL of glacial acetic acid 33% v / v was added to every well, after 15 minutes of incubation of the plates at 37°C, the light absorption of stained wells was detected with a wavelength of 570 nm in the ELISA reader (Stat Fax - 4200).

The results were divided according to Table 1, without the ability to form biofilms (-), weak (+), medium (++), and high strength (+++). To increase the accuracy of the experiment, each sample was repeated three times and the average obtained was considered as the final result of the experiment **(4)**.

DNA Extraction for Duplex PCR

The boiling method was used to extract the DNA content of bacterial isolates **(4)**. After extracting the DNA, evaluated qualitatively and quantitatively using

a spectrophotometer, and electrophoresis was carried out on 1% agarose gel. The extracted DNA was stored at -70°C until further analysis.

Duplex PCR Reaction for the Detection of *pap*C and *sfa* Genes

Amplification reactions were carried out in 25 µL volumes comprising; one microliter of target DNA (10 ng / µL), 12.5 µL of dye Master mix2X (CinaGen, Co., Tehran, Iran), 1 µL of each Forward and Revers primers (20 p/mol) (Forward primers for *pap*C F 5 -GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG-3 and Revers *PapC* R 5- ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA-3 and Forward primers for *sfa* F 5-CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC-3 and Revers primers *sfa* R 5- CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA-3) and 9.5 µL double distilled water.

Each program includes 30 cycles of PCR amplification under the following conditions: Initial denaturation at 94°C for 3 minutes, 30 thermal cycles including denaturation at 94°C for 1 minute, annealing at 59°C for 45 seconds, extension at 72°C for 1 minute and final extension it was 72°C for 5 minutes. The amplified products were visualized after electrophoresis on a 1% agarose gel and finally evaluated with a UV transilluminator. In the PCR test, distilled water was used as a negative control and the reference strain of *E. coli* ATCC 10536 was used as a positive control.

Statistical Analysis

The results were evaluated by Excel 2010 (Microsoft Office, Microsoft, Washington D.C, USA) and SPSS 2016 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and the non-independence test in inferential statistics to investigate the relationship between qualitative variables. P-value≤0.05 was analyzed as the significance level.

Results

Collection, Isolation, and Identification

Based on microscopic and biochemical tests, *E. coli* was isolated from 64 (64%) samples obtained from patients suspected of UTI**.**

Antibiotic Susceptibility Test

The results of the antibiogram test showed that out of 64 isolates, 20 (31%), 26 (40%), 8 (12.52%), 5 (8.7%), 3 (4.6%) and 2 (3.1%) isolates were resistant to ampicillin (AM), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), ciprofloxacin (CP), gentamicin, nitrofurantoin (FM), and amikacin (AN), respectively (Table 2).

Biofilm Formation by Microtiter Plate Method

The results of the study showed that out of 64 isolates studied, 31 isolates (48.4%) with high power, 10 isolates (15.6%) with moderate power and 14 isolates (21.8%) had biofilm formation capacity as a weak and only 9 isolates (14.2%) lacked biofilm production capacity. In other words, 85.8% of total isolates had the ability to biofilm formation. The results showed that there was high antibiotic resistance among bacteria with a high and moderate capacity of biofilm formation in comparison to bacteria with weak or without biofilms formation, however, no significant association was observed between antibiotic resistance and biofilm formation (P≤0. 05).

Detection of *pap*C and *sfa* Genes in UPEC Isolates by Duplex PCR

Detection of *pap*C and *sfa* genes was performed using the Duplex PCR technique. Duplex PCR reaction on DNA extracted from *E. coli* isolated in this study showed that 15 isolates (23.44%) had *pap*C gene and 10 isolates (15.62%) had *sfa* gene and 9 isolates (14.06%) have both *sfa* and *pap*C genes, simultaneously (Figure 1). Also, out of 15 *E. coli* isolates that had *pap*C gene, 14 isolates (93.3%) had the ability to biofilms formation and out of 10 *E. coli* isolates that had *sfa* gene, all (100%) could produce biofilms, and all nine strains containing both genes could produce biofilms as well. The results of this study showed that the *pap*C gene is more abundant among the isolates studied. The presence of *pap*C and *sfa* genes in these bacteria and their ability to produce biofilms are shown in Table 3. Examination of the results on the relationship between the presence of *pap*C gene and the ability to form biofilms showed that the P-value = 0.36, which is higher than 5%, indicating no significant relationship between the presence of *pap*C gene and biofilm formation, but given that Cramér's V coefficient is 0.224, indicating that there is a weak correlation between the variables. Regarding the relationship between the presence of the *sfa* gene and the ability to form biofilms, the *P*-value was = 0.624, which is higher than 5%, indicating a lack of a significant relationship between the presence of the *sfa* gene and biofilm formation, but considering that here too, Cramér's V coefficient was 0.166; it showed that there is a weak correlation between the variables.

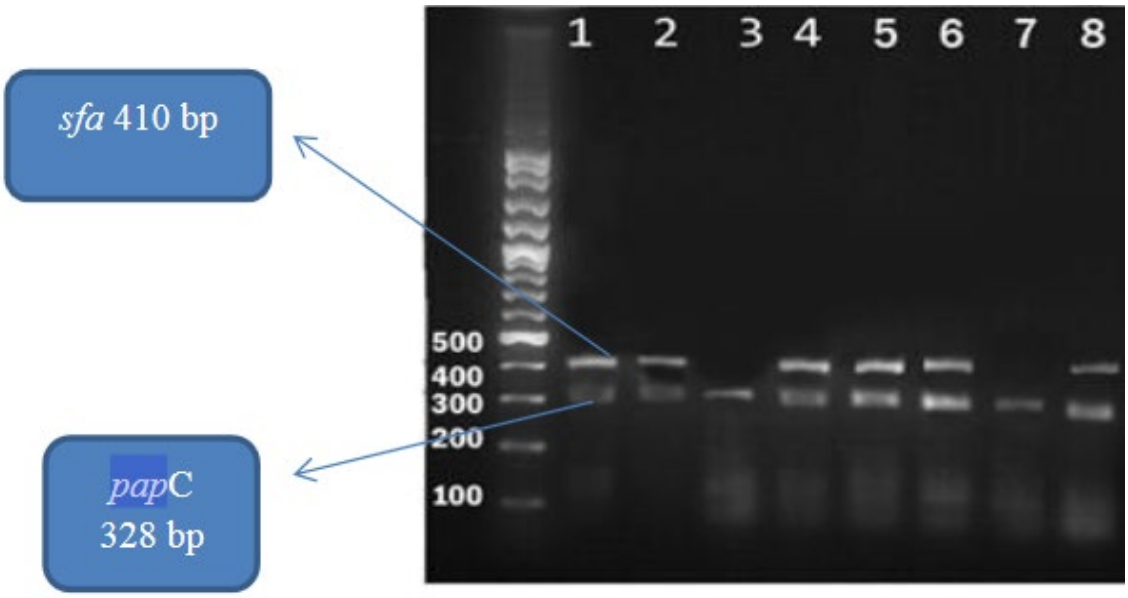


Figure 1. The results of electrophoresis of PCR products to identify genes *pap*C (328 bp) and *sfa* (410 bp), wells 1, 2, 4, 5, 6, and 8 are positive for both genes *pap*C (328 bp) and *sfa* (410 bp), and wells 3 and 7 are positive only for *pap*C (328 bp).

Discussion

Uropathogenic *E. coli* pathotypes are responsible for 70-90% of community-acquired UTI and 50% of hospital-acquired UTI **(12)**. UPEC damages the host tissue by colonization and biofilm formation in the mucosal epithelium. The attachment of urogenital bacteria to the epithelial cells is usually very important for biofilm formation because these bacteria do not wash out as quickly as other bacteria **(13)**. This bacterium can form intercellular aggregates similar to biofilm structures within the bladder epithelium; therefore, biofilm formation plays an important role in the pathogenesis of UPEC **(9)**. The *pap*C and *sfa* genes are the most common genes encoding pili in *E. coli* isolated from UTI that can help bind the bacterium to host tissues and form antibiotic-resistant biofilms. Identification of biofilm-producing UPEC strains is important to better understand the pathogenicity and antibiotic resistance of this bacterium in UTI. On the other hand, determining the antibiotic resistance pattern of *E. coli* causing UTI to identify effective drugs in the initial treatment of disease and the emergence of resistance can be important in controlling urinary tract infections. In different parts of Iran, several studies have been performed on *E. coli* strains isolated from UTI **(9)**; however, the overall results on the significant and pervasive resistances or emerging resistances of *E. coli* are not available in the country. Also, the trend of changing the pattern of antibiotic susceptibility of this main pathogen of the urinary tract in the country is not known. Considering the aforementioned points, the study was done on 100 samples of urine collected from pregnant women suspected of UTI, with ages between 20 and 25 years. Based on the results, *E. coli* was isolated from 64 (64%) samples obtained from patients suspected of UTI**.** These results show that *E. coli* is still the most common cause of urinary tract infections. In this study, the resistance of UPEC bacteria causing UTI to antibiotics was investigated. Based on the results; the highest levels of resistance were related to cotrimoxazole (40.6%), ampicillin (31.3%), ciprofloxacin (12.5%), gentamicin (7.8%), nitrofurantoin (4.6%), and amikacin (3.1%), respectively, which is consistent with the results of a study conducted by Mattai *et al.* in 2004 **(14)**. *E. coli* isolated in this study showed the highest sensitivity to amikacin (96.9%), which is consistent with the study of Abdollahi Kheirabadi *et al.*, in 2012, who reported the sensitivity of *E. coli* isolated from urinary specimens to amikacin (98%) **(15)**. Also, in a study conducted by Milani *et al.*, on the antibiotic susceptibility of bacteria isolated from people with UTI, the highest resistance was to ampicillin (95.3%) and the lowest resistance was to amikacin (6.6%) **(16)**. According to the results of this study, the level of resistance to ampicillin was higher than our findings, but in our study, most of the isolates were sensitive to amikacin. The results of the present study showed that more than 47% of the isolates were resistant to more than two groups of antibiotics. In a study conducted by Eslami *et al.* in Iran in 1995, 85.5% of isolates showed resistance to more than two antibiotics **(17)**. In a study by Molina_Lopez *et al*., (2011) in Mexico City, multidrug resistance strains of UPEC showed similar results **(18)**. In their study, the lowest resistance was to amikacin and nitrofurantoin, which is consistent with the results of the present study **(18)**. In the study of Mansouri *et al.*, the resistance to ciprofloxacin was 41%, gentamicin was

34.8% and cotrimoxazole was 93.5%, which has a higher resistance compared to the present study **(19)**; this may be due to differences in geographical areas and sources from which the bacterium has been isolated. One of the factors that play a role in pathogenesis as well as resistance to antimicrobial agents is the potential of biofilm formation. The first step in the process of colonization or infection is the attachment of bacteria to the host cell. In this study, the strength of biofilm formation was investigated by the microtiter plate method, which is a standard qualitative method **(4)**.

In this study, 48.4% of the isolates were strong biofilm producers, 15.6% were moderately potent, 21.8% were weak and 14.2% were not biofilm producers. In the study of Sevanan *et al.* in 2011, they used the biofilm formation method in the tube (Tube Method) and showed that 9.4% of the isolates were high strength biofilm producer, 34.4% of the isolates were moderately potent, and 40.6% of the isolates with weak power could produce biofilm and 15.6% could not produce biofilm; These results showed more biofilm formation compared to microtiter plate method **(20)**. Rawa'a Al-Chalabi *et al.* also reported in 2010 that 90% of UPEC strains can form biofilms **(21)**. In a 2012 study by Ponnusamy *et al.*, out of 100 strains of UPEC, 72 strains showed positive biofilm phenotypes, of which 17% were high strength, 19% were moderately potent, and 36% of the isolates were with weak power **(22)**. In a study conducted by Katongole *et al.* in 2020 on 200 UPEC isolates, biofilm production was reported to be 62.5% **(23)**. The results of this study show a slight difference compared to our study, which could be due to the type of method used to measure the biofilm and differences in the sources of the sample.

In this study, the Duplex PCR method was used to evaluate the presence *of pap*C and *sfa* genes in UPEC isolates. The results showed, 15 isolates (23.4%) carried the *pap*C gene and 10 isolates (15.6%) had the *sfa* gene and 9 isolates (14.06%) have both *sfa* and *pap*C genes, simultaneously. In a study by Katongole *et al.*, 22% and 13% of *pap*C and *sfa* genes were reported, respectively **(23)**. In the study of Tarchouna *et al.*, the frequency of *pap*C was 41% and the frequency of the *sfa* / *foc* gene was 34% **(24)**. In a study conducted by López-Banda *et al.* in Mexico on 108 *E. coli* isolated from women with UTI, pathogenic genes, and drug resistance were examined in phylogenetic groups, and the frequency of *sfa*S and *pap*C was reported to be 1.9% and 62%, respectively **(25)**. In a study conducted by Najafi *et al.* in 2017 in Bushehr, Iran, on 140 UPEC isolates, the frequency of the *pap*C gene was 38.6% and the frequency of the *sfa* / foc gene was 0.7% **(26)**. The prevalence of *the pap*C gene was 53.3% in a study by Asadi *et al.,* in 2014 **(27)**. In a study by Abe *et al.,* in 225 *E. coli* in Brazil, they determined the frequency of *pap* and *sfa* genes to be 45.8% and 29.8%, respectively **(28)**. A 2008 study by Grude *et al.* on 30 fluoroquinolone-resistant UPEC in Norway found that the frequency of *pap* and *sfa* genes was 27% and 0%, respectively **(29)**. In the study of Tiba *et al.*, which was performed in 2008 on 162 UPEC isolates in Brazil, the frequencies of *pap*, *afa,* and *sfa* genes were reported to be 32.7%, 27.8%, and 6.2%, respectively **(30)**. In 2006, Arisoy *et al.* determined the frequency of *pap* and *sfa* genes to be 22.98% and 6.21%, respectively, by examining 161 UPEC isolates **(31)**. In another study performed by Fathollahi *et al.* on *E. coli*, isolated from various forms of UTI, the prevalence of pap operon was reported **(32)**. Out of 123 *E. coli* isolates collected from UTI by Karimian *et al.*, 27% had *pap* gene and 14.6% had *sfa* gene **(33)**. In Bahalo *et al.* study, the frequency of the *pap* gene was 40% and the *sfa* gene was 30% **(34)**. On the other hand, in the report of Mohajeri *et al.,* the frequency of the *pap* gene was 20.5% and the frequency of the *sfa* gene was 21.5% **(35)**. As shown in the results of various studies, in almost all of them, the amount of *pap* gene is higher than s*fa* gene, which is consistent with the results of our research, but there is also a difference in the mentioned percentages, which may be due to differences in the number of isolates, type of samples, location of collection, the type of primer and even the protocol used for PCR. In a 2018 study by Zamani *et al.* on UPEC, the relationship between biofilm formation potential and genes involved in the attachment was evaluated and it was reported that there is a moderate to a strong relationship between *sfa*S and biofilm formation ability in biofilm-producing isolates **(36)**. However, no significant relationship was observed between the presence of the *pap*C gene and the ability to biofilm formation **(36)**. Also, in the study of Katongole *et al.*, it was found that 50% of isolates containing *the pap*C gene were able to biofilm formation, but 53.8% of isolates containing the *sfa* gene were able to produce biofilms **(23)**. The results of the present study also showed that 14 isolates (93.3%) that had the *pap*C gene, and all (100%) isolates that had *sfa* gene, could produce biofilms. Also, all 9 isolates that had both studied genes simultaneously could produce biofilms. However, the results indicate the role of these genes in biofilm formation; the statistical study showed that up to the level of P-value ≤ 0.05, there was no significant relationship between antibiotic resistance and biofilm formation, as well as between the ability to form biofilm and having *pap*C and *sfa* genes because there were many isolates biofilms lacked the above genes, or although antibiotic resistance was higher among isolates capable of biofilm, a significant number were sensitive to the antibiotics studied despite their ability to produce biofilms. This confirms that; although biofilm

production increases antibiotic resistance in bacteria, drug resistance does not depend only on the presence of biofilm and many other factors such as the presence of degrading enzymes, the presence of effusion pumps, changes in the site of action, etc. also play a role in resistance. However, having fimbriae are effective in biofilm formation, but in addition to fimbriae, numerous other factors in bacteria (including the presence of capsules and surface proteins, etc.) are effective in biofilm formation, and these results are consistent with the results of other studies **(1, 4, 6, 7, 8, 20, 22)**.

Conclusion

According to the results of this study, UPEC is still the main cause of UTI and can produce a biofilm and the binding power of this bacterium in this field has an irreversible role. On the other hand, the ability to create biofilms in 100% of isolates that have *pap*C and *sfa* genes encoding fimbriae shows that fimbriae can play an effective role in this feature. The results also showed that there is a direct relationship between biofilm formation power and increased drug resistance in UPEC bacteria; Therefore, determining the pattern of *E. coli* antibiotic resistance in isolates obtained from UTI nationwide is very important in identifying effective drugs in the prevention and initial treatment of UTI.

Acknowledgment

This research paper is taken from the student dissertation of Master of Microbiology. The authors of this article would like to express their gratitude to the dean of the Faculty of Science and the experts of the Microbiology Research Laboratory of the Islamic Azad University, Karaj Branch.

Funds

This research has been done at personal expense and with the help and assistance of Islamic Azad University, Karaj Branch, and in the form of a master's thesis.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest between the authors of the article. All authors endorsed the final manuscript.

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۵ ـ شماره ۲ ـ فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۰

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توانایی تشکیل بیوفیلم در *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن جداسازی شده از زنان باردار در شهر کرج

مریم نیک زاد[۱]، رضا میرنژاد[۲]، ابراهیم باباپور[۳]*

۱. کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
۲. استاد باکتری‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشگاه سیستم بیولوژی و مسمومیت‌ها دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج). تهران، ایران
۳. استادیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۶

پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۰

انتشار آنلاین: ۱۴۰۰/۰۱/۲۰

موضوع: باکتری شناسی پزشکی

نویسندهٔ مسئول:

ابراهیم باباپور ، استادیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

ایمیل:

e.babapour@kiau.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن شایع‌ترین عامل عفونت دستگاه ادراری است. اتصال این باکتری‌ها به سلول‌های اپی‌تلیال و تشکیل بیوفیلم سبب می‌گردد، تا این باکتری‌ها بیشتر در مجاری ادراری کلونیزه و به‌سختی حذف شوند. هدف از این مطالعه تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بررسی قدرت تشکیل بیوفیلم در *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن جداسازی‌شده از زنان باردار در شهر کرج بود.

مواد و روش کار: این مطالعه به‌صورت توصیفی – تحلیلی بر روی ۶۴ جدایه *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن انجام شد. شناسایی این باکتری‌ها با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی از طریق روش کربی- بوئر و مطابق توصیه موسسه استاندارد آزمایشگاهی و بالینی CLSI (2017) تعیین شد. توانایی تشکیل بیوفیلم، با استفاده از روش میکروتیترپلیت و حضور ژن‌های *pap* و *sfa* به روش Duplex PCR بررسی شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج، بیشترین میزان مقاومت مربوط به کوتریموکسازول (۴۰/۶٪) و آمپی‌سیلین (۳۱/۳٪)، بود. بررسی تشکیل بیوفیلم به روش فنوتیپی نیز نشان داد که ۴۸/۴ ٪ با توان بالا، ۱۵/۶٪ با توان متوسط و ۲۱/۸٪ با توان ضعیف، دارای قدرت تشکیل بیوفیلم دارند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده Duplex PCR، ۱۵ جدایه واجد ژن *papC*، ۱۰ جدایه واجد ژن *sfa* و ۹ جدایه نیز به‌طور هم‌زمان دارای هر دو ژن بودند. ۱۰۰٪ جدایه‌هایی که دارای هر دو ژن *papC* و *sfa* بودند، توانایی ایجاد بیوفیلم را داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که بیشتر *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن عامل عفونت‌های ادراری، توانایی تشکیل بیوفیلم رادارند. همچنین فراوانی ژن‌های *papC* و *sfa* کد کننده پیلی نیز در این جدایه‌ها می‌توانند به‌عنوان یکی از عوامل اتصال این باکتری‌ها عمل کند.

کلید واژه‌ها: *اشریشیا کلی یوروپاتوژن، بیوفیلم، Duplex PCR*

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

اشریشیا کلی، شایع‌ترین عامل عفونت‌های ادراری در انسان است. جایگاه اکولوژیک، توانایی اتصال و مقاومت در برابر خاصیت شویندگی ادرار و تشکیل بیوفیلم، ازجمله عواملی هستند که سبب می‌گردد تا UPEC، به‌عنوان اصلی‌ترین عامل عفونت‌های ادراری در انسان باشد. این باکتری یک‌گونه فوق‌العاده متنوع است که توانایی کلونیزه شدن و پایداری در نیچ‌های بی‌شماری در میزبان‌های حیوانی، انسانی و محیط را دارد (۱). بعضی از سویه‌های *اشریشیا کلی* می‌توانند از سویه‌های کامنسال خودشان متمایز شوند و بیماری‌زایی طبیعی بیشتر را در دستگاه گوارش، بافت‌ها و اندام‌های دیگر میزبان ایجاد کنند. این سویه‌های پاتوژن به‌طور گسترده به‌عنوان *اشریشیا کلی* اسهال زا یا *اشریشیا کلی* پاتوژن خارج روده‌ای (Extra-intestinal Pathogenic *E.coli*) طبقه‌بندی می‌شوند (۲). از میان ExPEC ها، سویه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن یا UPEC با بیماری‌زایی مجاری ادراری انسان در ارتباط است. سویه‌های UPEC به‌عنوان پاتوژن فرصت‌طلب داخل سلولی عمل می‌کنند و با توجه به حساسیت و رفتار میزبان و توسط به‌کارگیری فاکتورهای ویرولانس مختلف برای کلونیزه شدن در دستگاه ادراری برتری کسب می‌کنند (۳،۲،۱). سویه‌های UPEC می‌توانند در مجاری ادراری و در مثانه

کلونیزه شده و ایجاد التهاب مثانه کنند و همچنین از طریق حالب به کلیه‌ها صعود کرده و باعث ایجاد پیلونفریت شوند. مولکول‌ها و ساختارهای مختلف سطح سلولی در تشکیل بیوفیلم در *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن دخیل هستند (۳).

بیوفیلم ها مجموعه‌ای از سلول‌های میکروبی هستند که به‌طور برگشت‌ناپذیر به سطح وابسته‌اند و به‌وسیله شستشو ملایم از بین نمی‌روند (۴). علاوه بر این، تمایل سلول‌های غیر متصل (Planktonic) به سطح بیوفیلم بالغ، تغییرات فنوتیپی را ایجاد می‌کند که دارای پیامدهای عمده‌ای از قبیل افزایش مقاومت به عوامل ضد میکروبی و مقاومت در برابر دفاع میزبان است. این تغییرات فنوتیپی باعث تغییر سلول‌های *اشریشیا کلی* از حالت غیر متصل به حالت متصل می‌شود (۵).

بیش از ۵۰٪ همه عفونت‌های باکتریایی گزارش‌شده بیوفیلم تشکیل می‌دهند. رشد بیوفیلم باکتری‌های پاتوژن اغلب منجر به عفونت‌هایی می‌شود که تحمل به آنتی‌بیوتیک‌ها و پاسخ‌های ایمنی میزبان را افزایش می‌دهد (۶).

اتصال باکتری به سلول‌های یورو اپی‌تلیال به باکتری اجازه می‌دهد تا در مقابل عملکرد تخلیه مثانه و فعال شدن مسیرهای انتقال پیام در میزبان مقاومت کند .ازاین‌رو، اتصال باکتری به سلول‌های یورو اپی‌تلیال یک مرحله مهم برای شروع و گسترش عفونت مجاری ادراری است، زیرا برخلاف سایر باکتری‌ها، این باکتری‌ها، به‌سرعت شسته نمی‌شوند (۷). این اتصال به‌واسطه یکی از ادهسین های باکتریایی به نام فیمبریه P که توسط ژن *pap* یا pyelonephritis associated pili کد می‌شود اتفاق میافتد (۷). فیمبریه P در کلونیزاسیون باکتری در مجاری ادراری فوقانی، اتصال به اندوتلیوم عروق کلیوی و نهایتاً ایجاد پیلونفریت نقش دارد (۷). از دیگر فاکتورهای ادهسینی مهم در رابطه با این موضوع فیمبریه S است که توسط ژن *sfa* یا S fimbrial adhesion کد می‌شود . ژن‌های فوق از نوع ادهسین های مقاوم به مانوز بوده و بر روی ناحیه‌ای از کروموزوم به نام جزیره بیماری‌زایی قرار دارند (۸).

ژن‌های *pap* و *sfa* شایع‌ترین ژن‌های کد کننده پیلی در *اشریشیا کلی*‌های جداشده از عفونت ادراری هستند که می‌توانند به اتصال این باکتری به بافت های میزبانی و تشکیل بیوفیلم های مقاوم به آنتی‌بیوتیک کمک کنند. شناسایی سویه‌های UPEC تولیدکننده بیوفیلم برای درک بهتر بیماری‌زایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری در ایجاد عفونت ادراری حائز اهمیت است (۹). از طرفی تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اشریشیا کلی* در جدایه‌های به‌دست‌آمده از عفونت‌های ادراری در سطح کشور، در راستای شناخت داروهای مؤثر در درمان اولیه عفونت‌های ادراری و ایجاد مقاومت‌های نوظهور در این پاتوژن شایع عفونت ادراری، می‌تواند در کنترل عفونت‌های ادراری بسیار، بااهمیت باشد؛ بنابراین با توجه به مطالب ذکرشده این تحقیق با اهداف، تعیین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *اشریشیا کلی* عامل عفونت‌های مجاری ادراری، بررسی قدرت تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش میکروتیترپلیت و بررسی ژن‌های فیمبریه‌ای *papC* و *sfa* با استفاده روش Duplex PCR و ارتباط بین آن‌ها انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به‌صورت توصیفی – تحلیلی بر روی ۱۰۰ نمونه از کشت باکتری مربوط به خانم‌های باردار که دارای سنین بین ۲۰ تا ۲۵ سال مشکوک به عفونت دستگاه ادراری (UTI) انجام شد.

جمع‌آوری، جداسازی و شناسایی:

در این بررسی، طی مدت ۳ ماه (از بهمن‌ماه سال ۱۳۹۵ تا اردیبهشت‌ماه سال ۱۳۹۶) تعداد ۱۰۰ نمونهٔ ادرار از خانم‌های باردار مشکوک به عفونت دستگاه ادراری (UTI)، از مراکز بهداشت جامع سلامت شهرستان کرج جمع‌آوری گردید و سپس به‌منظور جداسازی *اشریشیا کلی* و اطمینان از خالص بودن نمونه‌ها، هرکدام از نمونه‌ها به‌طور مجزا ابتداء بر روی محیط کشت مک کانکی آگار و سپس بر روی کشت نوترینت آگار کشت داده شدند و با تست‌های میکروسکوپی و بیوشیمیایی متداول حضور باکتری *اشریشیا کلی* تائید شد.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن

برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی *اشریشیا کلی* جداسازی شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از روش دیسک دیفیوژن یا انتشار در آگار به روش کربی- بوئر و مطابق با توصیه موسسه استاندارد آزمایشگاهی و بالینی CLSI (2017) انجام شد. در این تحقیق حساسیت جدایه های *اشریشیا کلی* نسبت به شش آنتی‌بیوتیک از کلاس‌های مختلف، شامل آمپی‌سیلین ۱۰µg (AM)، کوتریموکسازول ۲۵µg (SXT)، سیپروفلوکساسین ۵µg (CP)، جنتامایسین ۱۰µg (GM)، نیتروفورانتوئین ۳۰۰µg (FM) و آمیکاسین ۳۰µg (AN) تهیه‌شده از شرکت پاتن طب و با روش انتشار دیسک در محیط کشت مولرهینتون آگار (مرک المان) و بر اساس دستورالعمل CLSI (2017) انجام گردید؛ و از سویه‌ی رفرنس *اشریشیا کلی* ATCC 25922 برای کنترل دیسک‌های آنتی‌بیوگرام استفاده شد (۱۰).

بررسی تشکیل بیوفیلم UPEC با روش میکروتیترپلیت

در این روش از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط مایع لوریا برتانی (LB) ابتدا رقت نیم مک فارلند تهیه نموده و سپس ۱۰ میکرولیتر

از آن را به ۹۹۰ میکرولیتر از محیط لیتر لوریا برتانی (LB) استریل ریخته تا رقت ۱٪ تهیه گردد و سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از آن به سه حفره از پلیت مخصوص کشت بافت ته صاف اضافه شد، بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس ابتدا آن را ۳ مرتبه با بافر فسفات سالین با pH ۷/۳ شستشو داده تا باکتری‌هایی که به جدار پلیت متصل نیستند خارج شوند. سپس با ۲۵۰ میکرولیتر متانول خالص به مدت ۱۵ دقیقه آن فیکس گردید. در ادامه با اضافه نمودن ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۲٪ به مدت ۵ دقیقه عمل رنگ‌آمیزی انجام و در ادامه با استفاده از بافر فسفات سالین عمل شستشو صورت گرفت و سپس با ۱۶۰ میکرولیتر اسید استیک گلایسیال ۳۳٪ حجمی/حجمی به‌عنوان حلال پرکرده، بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس جذب نوری چاهک‌های رنگ‌شده با کریستال ویوله، با طول‌موج ۵۷۰ نانومتر در دستگاه الیزا ریدر (Stat Fax - 4200) بررسی شدند.

نتایج بر اساس جدول شماره (۱) به‌صورت فاقد قدرت تشکیل بیوفیلم (–)، ضعیف (+)، متوسط (++) و قدرت بالا (+++) تقسیم‌بندی گردید. برای بالا بردن دقت آزمایش هر نمونه سه مرتبه تکرار و متوسط به‌دست‌آمده به‌عنوان نتیجه نهایی آزمایش در نظر گرفته شد (۴)

جدول ۱. تقسیم‌بندی باکتری‌ها بر اساس قدرت تشکیل بیوفیلم درروش میکروتیترپلیت

Mean OD value	Adherence	Biofilm formation
OD ≤ ODc	None	**None**
ODc < OD ≤ 2 ODc	Weak	**Weak**
2 ODc < OD ≤ 4 ODc	Moderate	**Moderate**
4 ODc < OD	Strong	**High**

OD = میزان جذب نوری نمونه مورد آزمایش در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر

ODc = میانگین میزان جذب نوری نمونه کنترل منفی در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر

استخراج DNA باکتری جهت انجام Duplex PCR

برای استخراج محتوای DNA جدایه های باکتریایی از روش جوشاندن استفاده شد (۴). پس از استخراج DNA، ارزیابی کیفی و کمی آن با استفاده از اسپکتروفتومتر و الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪ انجام شد. DNA استخراج‌شده تا زمان انجام PCR در ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

انجام واکنش Duplex PCR به‌منظور تائید وجود ژن‌های *papC* و *sfa* در جدایه های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر DNA هدف (۱۰-۲۰ng/µL)، ۱۲/۵µL ماسترمیکس رنگی 2X از شرکت سینا کلون، ۱µL از هریک از پرایمرهای رفت‌وبرگشت (۲۰ پیکومول)(- *PapC* F 5′ GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG-3′ و *PapC* R 5′- ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA-3′ و *sfa* F 5′- CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC-3′ و *sfa* R 5′- CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA-3′) و ۹/۵ µL آب مقطر دو بار تقطیر و هر برنامه PCR شامل ۳۰ چرخه تکثیر و تحت شرایط زیر بود. دناتوراسیون اولیه ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در دمای ۵۹°C به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر در دمای۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه بود. پس از اتمام مراحل Duplex PCR،محصول حاصل از آن، الکتروفورز شد و در پایان با دستگاه UV ترانس لومیناتور (UV transluminator) مورد ارزیابی قرار گرفت. در انجام آزمایش PCR از آب مقطر به‌عنوان نمونه کنترل منفی و از سویه‌ی رفرنس *اشریشیا کلی* ATCC 25922 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

آنالیز آماری

یافته‌ها، به‌وسیله نرم‌افزارهای اکسل ۲۰۱۰ (Microsoft Office, Microsoft, Washington D.C, USA)، SPSS 2016 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ارزیابی شد و از آزمون عدم استقلال در آمار استنباطی برای بررسی ارتباط بین متغیرهای کیفی استفاده شد و P-value ≤۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌داری تجزیه تحلیل گردید.

یافته ها

جمع‌آوری، جداسازی و خالص‌سازی:

بر اساس نتایج حاصل از آزمایشات بیوشیمیایی و میکروسکوپی ۶۴ نمونه از ۱۰۰ از نمونه اخذشده از بیماران مشکوک به عفونت ادراری آلوده به *اشریشیا کلی* (۶۴٪) بودند.

نتایج تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی:

نتایج حاصل تست آنتی‌بیوگرام با استفاده از روش Kirby – Bauer نشان داد از مجموع ۶۴ جدایه **UPEC**، جداشده از نمونه‌های عفونت ادراری ۲۰ جدایه (۳۱٪) مقاوم به آمپی‌سیلین (AM)، ۲۶ جدایه مقاوم (۴۰٪) به کوتریموکسازول (SXT)، ۸ جدایه (۱۲/۵۲٪) مقاوم به سیپروفلوکساسین (CP)، ۵ جدایه (۷/۸٪) مقاوم به جنتامایسین (GM)، ۳ جدایه مقاوم (۴/۶٪) به نیتروفورانتوئین (FM) و ۲ جدایه (۳/۱٪) به آمیکاسین (AN) مقاومت بودند (جدول ۲).

جدول ۲. نتایج حاصل از تست تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش کربی ـ بائر

دیسک‌های آنتی‌بیوتیک	حساس(٪)	نیمه حساس (٪)	مقاوم (٪)
آمپی‌سیلین ۱۰ میکروگرم (AM)	۴۰(٪۶۲/۶)	۴(٪۶/۲)	۲۰(٪۳۱/۲)
کوتریموکسازول ۲۵ میکروگرم (SXT)	۳۸(٪۵۹/۴)	۰	۲۶(۴۰٪/۶)
سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم (CP)	۵۶(٪۸۷/۵)	۰	۸(٪۱۲/۵)
جنتامایسین ۱۰ میکروگرم (GM)	۵۹(٪۹۲/۲)	۰	۵(٪۷/۸)
نیتروفورانتوئین ۳۰۰ میکروگرم (FM)	۶۱(٪۹۵/۴)	۰	۳(٪۴/۶)
آمیکاسین ۳۰ میکروگرم (AN)	۶۲(٪۹۶/۹)	۰	۲(٪۳/۱)

نتایج تست تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیترپلیت:

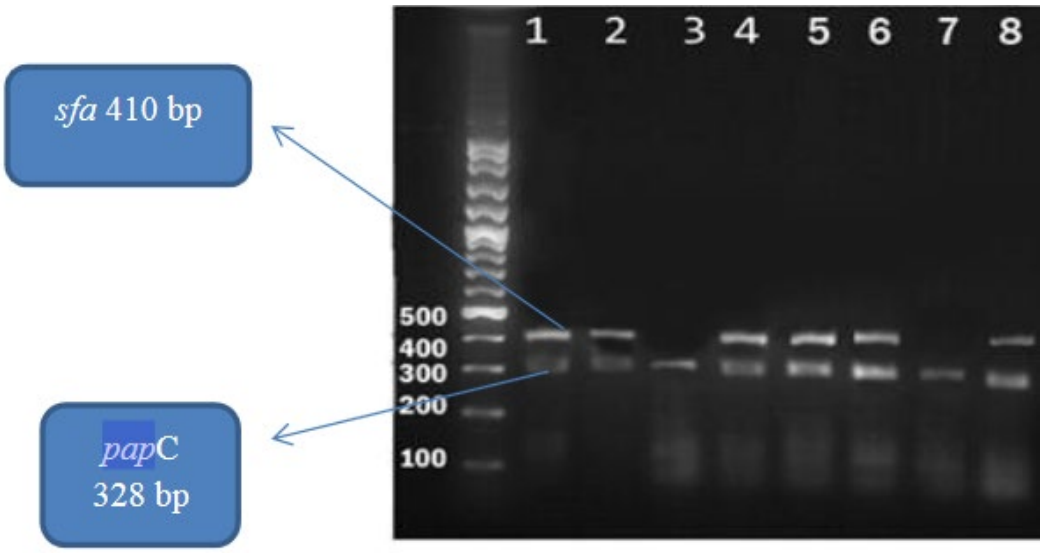
نتایج حاصل از بررسی نشان داد که از ۶۴ جدایه موردمطالعه ۳۱ جدایه (۴۸/۴٪) با توان بالا ۱۰ جدایه (۱۵/۶٪) با توان متوسط و ۱۴ جدایه (۲۱/۸٪) به‌طور ضعیف دارای قدرت تشکیل بیوفیلم بودند و فقط ۹ جدایه (۱۴/۲٪) فاقد قدرت تولید بیوفیلم بودند. به عبارتی ۸۵/۸٪ از کل جدایه‌ها توان تشکیل بیوفیلم را دارا بودند. نتایج نشان داد که باکتری‌های که با توان بالا و متوسط توان تشکیل بیوفیلم را داشتند نسبت به باکتری که با توان ضعیف و یا فاقد توان تشکیل بیوفیلم بودند، از مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشتری برخوردار بودند، ولی ارتباط معنی‌داری بین مقاومت دارویی و تشکیل بیوفیلم ($P \leq ۰/۰۵$) مشاهده نشد.

نتایج بررسی وجود ژن‌های *papC* و *sfa* در جدایه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن از Duplex PCR:

آشکارسازی ژن‌های *pap* و *sfa* با استفاده از تکنیک Duplex PCR انجام شد.

با انجام واکنش Duplex PCR بر روی DNA های استخراج‌شده از *اشریشیا کلی*های جداشده در این تحقیق مشخص گردید که ۱۵ جدایه (۲۳/۴۴٪) دارای ژن *papC* و ۱۰ جدایه (۱۵/۶۲٪) دارای ژن *sfa* بودند و تعداد ۹ جدایه (۱۴/۰۶٪) به‌طور همزمان دارای ژن‌های *sfa* و *papC* هستند (شکل ۱). همچنین از بین ۱۵ جدایه *اشریشیا کلی* که دارای ژن *papC* بودند، ۱۴ جدایه (۹۳/۳٪) توانایی تشکیل بیوفیلم را دارا بودند و از ۱۰ جدایه *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن جدایه شده‌ای که دارای ژن *sfa* بودند، همگی (۱۰۰٪) دارای توانایی ایجاد بیوفیلم را بودند و تمام ۹ جدایه که دارای هر دو ژن موردمطالعه به‌طور همزمان بودند همگی دارای توانایی ایجاد بیوفیلم نیز بودند. نتیجه این مطالعه نشان داد که ژن *papC* در بین جدایه‌های موردمطالعه، فراوانی بیشتری دارد. درصد حضور ژن‌های *papC* و *sfa* این باکتری‌ها و درصد توانایی ایجاد بیوفیلم، در جدول شماره ۳، نشان داده‌شده است. بررسی نتایج در خصوص رابطه بین وجود ژن *papC* و توانایی تشکیل بیوفیلم نشان داد که مقدار **P-value= ۰/۳۶** است که چون بالاتر از ۵٪ است، نشان‌دهنده عدم ارتباط معنی‌دار بین حضور ژن *papC* و تشکیل بیوفیلم است ولی با توجه به اینکه ضریب Cramér's V برابر ۰/۲۲۴ بود، نشان می‌داد که ارتباط ضعیفی بین متغیرها وجود دارد. در خصوص رابطه بین وجود ژن *sfa* و توانایی تشکیل بیوفیلم نیز، مقدار **P-value= ۰/۶۲۴** بود که بالاتر از ۵٪ است و نشان‌دهنده

عدم ارتباط معنی‌دار بین حضور ژن *sfa* و تشکیل بیوفیلم هست، ولی با توجه به اینکه در اینجا نیز، ضریب Cramér's V برابر ۰/۱۶۶ بود، نشان می‌داد که ارتباط ضعیفی بین متغیرها وجود دارد.



شکل ۱. نتایج الکتروفورز محصول PCR جهت شناسایی ژن‌های *papC* (328 bp) و *sfa* (410 bp)، چاهک‌های ۱، ۲، ۴، ۵، ۶ و ۸ هر دو ژن *papC* (328 bp) و *sfa* (410 bp)، مثبت و چاهک ۳ و ۷ فقط *papC* (328 bp) مثبت است

جدول ۳. نتایج تشکیل بیوفیلم UPEC با روش میکروتیترپلیت و فراوانی ژن‌های *papC* و *sfa*

Organism and *papC*, *sfa* genes	No of Isolates	Strong Biofilm Formation	Moderate Biofilm Formation	Weak Biofilm Formation	Negative Biofilm Formation
E. coli	64(100%)	31(48.4%)	10(15.6%)	14(21.8%)	**9(14.2%)**
papC	15(23.44%)	6(9.38%)	5(7.81%)	3(4.69%)	**1(1.56%)**
sfa	10(15.62%)	5(7.81%)	2(3.13%)	3(4.69%)	**0**
papC and *sfa*	9(14.06%)	5(7.81%)	2(3.13%)	2(3.13%)	**0**

بحث

پاتوتایپ *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن عامل ۹۰-۷۰٪ عفونت مجاری ادراری اکتسابی از جامعه و ۵۰٪ از عفونت‌های ادراری اکتسابی از بیمارستان است (۱۲). کلونیزه شدن و تشکیل بیوفیلم، *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن در اپی‌تلیوم مخاطی به بافت میزبان آسیب می‌رساند.اتصال باکتری‌های یوروژنیتال به سلول‌های اپی‌تلیال معمولاً برای تشکیل بیوفیلم بسیار مهم و اساسی است زیرا این باکتری‌ها برخلاف سایر باکتری‌ها به‌سرعت شسته نمی‌شود (۱۳). این باکتری قادر است تجمعات بین سلولی مشابه ساختارهای بیوفیلم، درون اپی‌تلیوم مثانه تشکیل دهند؛ بنابراین تشکیل بیوفیلم نقش مهمی در پاتوژنز UPEC ایفا می‌کند (۹). ژن‌های *pap* و *sfa* شایع‌ترین ژن‌های کدکننده پیلی در *اشریشیا کلی‌های* جداشده از عفونت ادراری هستند که می‌توانند به اتصال این باکتری به بافت های میزبانی و تشکیل بیوفیلم های مقاوم به آنتی‌بیوتیک کمک کنند. شناسایی سویه‌های UPEC تولیدکننده

بیوفیلم برای درک بهتر بیماری‌زایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری در ایجاد عفونت ادراری حائز اهمیت است. از طرفی تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اشریشیا کلی* در جدایه های عفونت ادراری در سطح کشور در راستای شناخت داروهای مؤثر در درمان اولیه عفونت‌های ادراری و ایجاد مقاومت‌های نوظهور در این پاتوژن شایع عفونت ادراری، می‌تواند در کنترل عفونت‌های ادراری بااهمیت باشد. اگرچه در مناطق مختلف ایران بر روی سویه‌های *اشریشیا کلی* جدا سده از عفونت ادراری مطالعاتی انجام‌شده است (۹)؛ اما برآیند کلی نتایج این تحقیقات در مورد مقاومت‌های شاخص و فراگیر و یا مقاومت‌های نوظهور *اشریشیا کلی* در سطح کشور در دسترس نیست. همچنین روند تغییر الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی این پاتوژن اصلی دستگاه ادراری در سطح کشور مشخص نیست.

بنابراین با توجه به مطالب ذکرشده این تحقیق با اهداف، تعیین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *اشریشیا کلی* عامل عفونت‌های مجاری ادراری، بررسی قدرت تشکیل بیوفیلم *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک به روش فنوتیپی و بررسی فراوانی ژن‌های فیمبریه ای *pap* و *sfa* با استفاده روش Duplex PCR، ارتباط بین آن‌ها و بر روی ۱۰۰ نمونه‌ی ادرار جمع‌آوری‌شده از خانم‌های باردار که دارای سنین بین ۲۰ تا ۲۵ سال و مشکوک به عفونت دستگاه ادراری (UTI) بودند، انجام شد.

بر اساس نتایج حاصل از آزمایشات بیوشیمیایی و میکروسکوپی ۶۴ نمونه از ۱۰۰ از نمونه اخذشده از بیماران مشکوک به عفونت ادراری آلوده به *اشریشیا کلی* (۶۴٪) بودند. این نتایج نشان داد که *اشریشیا کلی* همچنان شایع‌ترین عامل عفونت‌های ادراری است.

در این مطالعه مقاومت باکتری UPEC مسبب عفونت ادراری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها موردبررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج؛ بیشترین میزان مقاومت به ترتیب مربوط به کوتریموکسازول (۴۰/۶٪)، آمپی‌سیلین (۳۱/۳٪)، سیپروفلوکساسین (۱۲/۵٪)، جنتامایسین (۷/۸٪)، نیتروفورانتوئین (۴/۶٪) و آمیکاسین (۳/۱٪) بود، که با نتایج مطالعه‌ای که توسط Mattai و همکاران، در سال ۲۰۰۴ صورت گرفت، مطابقت دارد (۱۴).

اشریشیاکلی‌های جداشده در این بررسی، بیشترین حساسیت را نسبت به آمیکاسین (۹۶/۹٪) نشان دادند که بامطالعه Abdollahi Kheirabadi و همکاران،در سال ۲۰۱۲ که حساسیت *اشریشیا کلی‌های* جداشده از نمونه‌های ادراری را نسبت به آمیکاسین (۹۸٪) گزارش نمودند مطابقت دارد (۱۵).

همچنین در تحقیقی که توسط Milani و همکاران، در طی سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۵ بر روی حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جداشده از افراد مبتلابه UTI انجام شد، بیشترین مقاومت را نسبت به آمپی‌سیلین(۹۵/۳٪) و کمترین مقاومت را به آمیکاسین ۶/۶٪ گزارش نمودند(۱۶). با توجه به نتایج این تحقیق، میزان مقاومت به آمپی‌سیلین نسبت به یافته‌های ما بیشتر بوده است ولی در مطالعه ما نیز اغلب جدایه‌ها نسبت به آمیکاسین حساسیت نشان دادند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد، بیش از ۴۷٪ از جدایه‌ها به بیش از دو گروه آنتی‌بیوتیک‌ها موردمطالعه مقاوم بودند. در مطالعه‌ای که توسط Eslami و همکاران، در ایران در سال ۲۰۱۰ انجام شد ۸۵/۵ درصد از جدایه‌ها مقاومت به بیش از دو آنتی‌بیوتیک را نشان دادند (۱۷). در مطالعه Molina_Lopez و همکاران، در سال ۲۰۱۱ در مکزیکوسیتی، مقاومت چندگانه در سویه‌های UPEC نتایج مشابهی را نشان می‌داد (۱۸).

در این مطالعه کمترین مقاومت نسبت به آمیکاسین و نیتروفورانتوئین بود که مشابه مطالعات Molina_Lopez و همکاران، در سال ۲۰۱۱ است (۱۸).

در مطالعه‌ی Mansouri و همکاران، میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین ۴۱٪، جنتامایسین ۳۴/۸٪ و کوتریموکسازول ۹۳/۵٪ بود که در مقایسه بامطالعه حاضر از مقاومت بالاتری برخوردار است (۱۹)؛ که این می‌تواند به علت تفاوت مناطق جغرافیایی و منابعی باشد که باکتری از آن‌ها جداشده است.

یکی از عواملی که در پاتوژنز و همچنین در مقاومت به عوامل ضد میکروبی نقش ایفاء می‌کند قدرت تشکیل بیوفیلم است. اولین مرحله در فرایند کلونیزاسیون و یا عفونت، اتصال باکتری به سلول میزبان است. در این مطالعه قدرت تشکیل بیوفیلم را به روش میکروتیترپلیت که یک روش کیفی استاندارد محسوب می‌شود موردبررسی قرار گرفت (۴).

در این بررسی ۴۸/۴٪ از جدایه‌ها ازنظر توانایی ایجاد بیوفیلم، قوی،۱۵/۶٪ با توان متوسط و ۲۱/۸ ٪ از آن‌ها ضعیف و ۱۴/۲٪ هم فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم بودند. در مطالعه Sevanan و همکاران، در سال ۲۰۱۱، از روش تشکیل بیوفیلم در لوله (Tube Method) استفاده کردند و نشان دادند که ۹/۴٪ از جدایه‌ها باقدرت بالا،

۳۴/۴٪ از جدایه‌ها باقدرت متوسط، ۴۰/۶٪ از جدایه‌ها با توان ضعیف دارای توانایی ایجاد بیوفیلم و ۱۵/۶٪ نیز فاقد توانایی ایجاد بیوفیلم بودند؛ که در مقایسه با روش میکروتیترپلیت تشکیل بیوفیلم بیشتری را نشان دادند (۲۰). همچنین Rawa'a Al-Chalabi و همکاران، در سال ۲۰۱۰ گزارش کردند که ۹۰٪ از سویه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن توانایی تشکیل بیوفیلم رادارند (۲۱). در تحقیق Ponnusamy و همکاران، در سال ۲۰۱۲، از بین ۱۰۰ سویه *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن، ۷۲ سویه فنوتیپ بیوفیلم مثبت را نشان دادند که از بین آن‌ها ۱۷٪ با توان بالا، ۱۹٪ جدایه‌ها، با توان متوسط و ۳۶٪ با توان ضعیف بیوفیلم تشکیل می‌دادند (۲۲). در مطالعه‌ای که توسط Katongole و همکاران، در سال ۲۰۲۰ و بر روی ۲۰۰ ایزوله UPEC انجام شد، میزان تولید بیوفیلم ۶۲/۵٪ گزارش گردید (۲۳). نتایج این تحقیق در مقایسه بامطالعه ما کمی تفاوت را نشان می‌دهد که می‌تواند نوع روش بکار گرفته‌شده برای سنجش بیوفیلم و به علت تفاوت در منابع جداسازی نمونه‌ها باشد.

در این مطالعه از روش Duplex PCR، برای بررسی حضور ژن‌های ویرولانس *papC* و *sfa* *اشریشیا کلی* استفاده شد. در این مطالعه مشخص گردید ۱۵ جدایه (۲۳/۴٪) از ۶۴ جدایه ی موردمطالعه، دارای ژن *papC* و ۱۰ جدایه (۱۵/۶٪) نیز دارای ژن *sfa* بودند و ۹ جدایه (۱۴/۰۶٪) نیز به‌طور هم‌زمان هر دو ژن حضور داشتند. در مطالعه Katongole و همکاران، فروانی ژن *papC* و *sfa* به ترتیب ۲۲٪ و ۱۳٪ گزارش گردید (۲۳). در مطالعه Tarchouna و همکاران، میزان فروانی *papC* ۴۱٪ و فروانی ژن *sfa/foc* ۳۴٪ گزارش شد (۲۴). در مطالعه‌ای که López-Banda و همکاران، در مکزیک و بر روی ۱۰۸ ایزوله *اشریشیا کلی* جداشده از زنانی که دارای عفونت ادراری بودند، ژن‌های بیماری‌زا و مقاومت دارویی در گروه‌های فیلوژنیک موردبررسی قرار گرفت و در آن فراوانی ژن *sfaS*، ۱/۹٪ و فروانی ژن *papC*، ۶۲٪ گزارش گردید (۲۵). در مطالعه‌ای که توسط Najafi و همکاران، در سال ۲۰۱۷ در شهر بوشهر ایران و بر روی ۱۴۰ جدایه UPEC انجام شد، میزان فراوانی ژن *papC*، ۳۸/۶٪ و فراوانی ژن *sfa/foc*، ۰/۷٪ گزارش گردید (۲۶). در مطالعه Asadi و همکاران، در ۲۰۱۴ فروانی ژن *papC*، ۵۳/۳٪ بود (۲۷). در مطالعه‌ای که Abe et al در سال ۲۰۰۸، در برزیل برروی ۲۲۵ *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک انجام دادند فراوانی ژن‌های *pap* و *sfa* را به ترتیب ۴۵/۸٪ و ۲۹/۸٪ تعیین کردند (۲۸). در مطالعه‌ی Grude و همکاران، در سال ۲۰۰۸ بر روی ۳۰ نمونه *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک مقاوم به فلوروکینولون‌ها در نروژ مشخص شد که فراوانی ژن‌های *pap* و *sfa* به ترتیب ۲۷٪ و ۰٪ است (۲۹). در مطالعه Tiba و همکاران، نیز که در سال ۲۰۰۸ و بر روی ۱۶۲ جدایه *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک در برزیل انجام شد، فراوانی ژن‌های *pap*، *afa* و *sfa* به ترتیب ۳۲/۷٪، ۲۷/۸٪ و ۶/۲٪ گزارش گردید (۳۰). در سال ۲۰۰۶ نیز Arisoy و همکاران، با بررسی ۱۶۱ جدایه *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک فراوانی ژن‌های *pap* و *sfa* را به ترتیب ۲۲/۹۸٪ و ۶/۲۱٪ معین نمودند (۳۱).

در مطالعه دیگر که توسط Fathollahi و همکاران، بر روی ۱۳۰ جدایهٔ *اشریشیا کلی* جداشده از اشکال مختلف عفونت ادراری انجام شد، شیوع اپران *pap* را ۶۱٪ گزارش شد (۳۲). در تحقیق Karimian و همکاران،از ۱۲۳ جدایه *اشریشیا کلی* آوری شده از عفونت‌های ادراری،۲۷٪ دارای ژن *pap*، و ۱۴/۶٪ هم دارای ژن *sfa* بودند (۳۳). در مطالعه Bahalo و همکاران، فراوانی ژن *pap*، ۴۰٪ و ژن *sfa*، ۳۰٪ بیان شد (۳۴). از طرفی در گزارش Mohajeri و همکاران، فراوانی ژن *pap*، ۲۰/۵٪ و فراوانی ژن *sfa*، ۲۱/۵٪ گزارش گردید (۳۵). همانطوریکه در نتایج تحقیقات مختلف مشخص‌شده تقریباً در همه آن‌ها میزان ژن *pap* در مقایسه با ژن *sfa* بیشتر هست که با نتایج تحقیق ما مطابقت دارد اما تفاوت در درصدهای ذکرشده نیز وجود دارد که ممکن است به دلیل تفاوت در تعداد جدایه‌ها، نوع نمونه‌ها و محل جمع‌آوری، نوع پرایمر و حتی پروتکل مورداستفاده برای انجام PCR باشد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۸ توسط Zamani و همکاران که بر روی UPEC انجام شد، ارتباط بین قدرت تشکیل بیوفیلم و ژن‌های دخیل در اتصال مورد ارزیابی قرار گرفت و در آن گزارش گردید که بین *sfaS* و توانایی تشکیل بیوفیلم، در جدایه‌های تولیدکننده بیوفیلم های متوسط تا قوی، ارتباط وجود دارد، ولی بین وجود ژن *papC* و توانایی تشکیل بیوفیلم ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (۳۶). همچنین در مطالعه Katongole و همکاران، مشخص شد که ۵۰٪ از جدایه های حاوی ژن *papC* توانایی تشکیل بیوفیلم رادارند ولی ۵۳/۸٪ از جدایه های حاوی ژن *sfa* قابلیت تولید بیوفیلم را داشتند (۲۳). نتایج مطالعه حاضر نیز همچنین نشان داد، از بین ۱۵ جدایهٔ *اشریشیا کلی* که دارای ژن *papC* بودند، ۱۴ جدایه (۹۳/۳٪) و از ۱۰ جدایه *اشریشیا کلی* که دارای ژن *sfa* بودند، همگی (۱۰۰٪) دارای توانایی ایجاد بیوفیلم را بودند و تمام ۹ جدایه که دارای هر دو ژن موردمطالعه به‌طور هم‌زمان بودند همگی دارای توانایی ایجاد

بیوفیلم بودند. اگرچه، این نتایج نشان‌دهنده نقش این ژن‌ها در ایجاد بیوفیلم است؛ اما بااین‌حال و در کل، بررسی آماری نشان داد تا سطح ($P \leq ۰/۰۵$) بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم و همچنین بین توانایی تشکیل بیوفیلم و دارا بودن ژن‌های *papC* و*sfa* رابطه معنی‌داری وجود ندارد، چراکه جدایه‌های زیادی بودند که باوجود توانایی ایجاد بیوفیلم فاقد ژن‌های فوق بودند و یا باوجوداینکه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین جدایی‌هایی که دارای توانایی بیوفیلم، بیشتر بود، ولی تعداد قابل‌توجهی هم باوجود توانایی تولید بیوفیلم به آنتی‌بیوتیک‌های موردبررسی حساس بودند. این مطلب مؤید این نکته هست که؛ اگرچه تولید بیوفیلم سبب افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها می‌شود، ولی مقاومت دارویی فقط به وجود بیوفیلم بستگی ندارد و عوامل متعدد دیگری ازجمله وجود آنزیم‌های تجزیه‌کننده، وجود پمپ‌های افلاکس، تغییرات در جایگاه اثر و غیره در ایجاد مقاومت نقش دارد و همچنین اگرچه ژن‌های کد کننده پیلی در ایجاد بیوفیلم مؤثر است ولی علاوه بر پیلی عوامل متعدد دیگری در باکتری‌ها (ازجمله وجود کپسول و پروتئین‌های سطحی و...) در ایجاد بیوفیلم موثراند و این نتایج با نتایج مطالعات دیگر نیز مطابقت دارد (۲۲، ۲۰، ۱۵، ۸، ۷، ۶، ۱، ۴).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه UPEC همچنان اصلی‌ترین عامل عفونت مجاری ادراری بوده و توانایی ایجاد بیوفیلم و قدرت اتصال این باکتری در این زمینه نقش غیرقابل‌انکاری را دارا هست. از طرفی توانایی ایجاد بیوفیلم در ۱۰۰٪ از جدایه‌های که دارای ژن‌های *papC* و *sfa* کد کننده پیلی هستند نشان می‌دهد که دارا بودن پیلی می‌تواند در این ویژگی نقش مؤثری داشته باشد. نتایج همچنین، نشان داد که ارتباط مستقیمی بین قدرت تشکیل بیوفیلم و افزایش مقاومت دارویی در باکتری UPEC وجود دارد؛ بنابراین، تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اشریشیا کلی* در جدایه‌های به‌دست‌آمده از عفونت‌های ادراری در سطح کشور، در شناخت داروهای مؤثر در درمان اولیه عفونت‌های ادراری و کنترل عفونت‌های ادراری بسیار، بااهمیت است.

سپاسگزاری

این مقاله پژوهشی برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی است. نویسندگان این مقاله از ریاست محترم دانشکده علوم و کارشناسان محترم آزمایشگاه تحقیقاتی میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج نهایت تشکر و قدردانی رادارند.

تعارض در منافع

بین نویسندگان مقاله هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد همه نویسندگان نسخه نهایی خطی را تأیید کردند.

منابع مالی

این تحقیق با هزینه شخصی و با کمک و مساعدت دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و قالب پایان‌نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد انجام‌شده است.

Referance

1. Johanson I, Lindstedt R, Svanborg C. Roles of the pap and prs encoded adhesins in Escherichia coli adherence to human uroepithelial cells. Infect Immun.1992; 60: 3416-22. [DOI:10.1128/IAI.60.8.3416-3422.1992] [PMID] [PMCID]
2. Johnson D E, Lockatell C V, Russell R G, Hebel J R, Island M D, Stapleton A and et al. Comparison of Escherichia coli strains recovered from human cystitis and pyelonephritis infections in transurethrally challenged mice. Infect. Immun.1998; 66: 3059-65. [DOI:10.1128/IAI.66.7.3059-3065.1998] [PMID] [PMCID]
3. Marrs CF. Escherichia coli mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic E. coli (UPEC) pathotypes? FEMS Microbiol. Lett.2005; 18:190-252. [DOI:10.1016/j.femsle.2005.08.028] [PMID]
4. Babapour E, Haddadi A, Mirnejad R, Angaji S A, and Amirmozafari N. Biofilm formation in clinical isolates of nosocomial Acinetobacter baumannii and its relationship with multidrug resistance. Asian Pac J Trop Biomed. 2016; 6(6): 528-533. [DOI:10.1016/j.apjtb.2016.04.006]
5. Hanna A, Berg M, Stout V, Razatos A. Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic Escherichia coli. Applied Environmental Microbiology. 2003; 69(8): 4474-81. [DOI:10.1128/AEM.69.8.4474-4481.2003] [PMID] [PMCID]

6. Lane MC, Mobley H. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic Escherichia coli (UPEC) in the mammalian kidney. Kidney. 2007; 72: 19-25. [DOI:10.1038/sj.ki.5002230] [PMID]

7. Usein CR, Damian M, Tatu-Chitoiu D, Capusa C, Fagaras R, Tudorache D, Nica M, Le Bouguénec C. Prevalence of virulence genes in Escherichia coli strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases. J Cell Mol Med. 2001 Jul-Sep; 5(3):303-10. [DOI:10.1111/j.1582-4934.2001.tb00164.x] [PMID] [PMCID]

8. Schwartz DJ, Conover MS, Hannan TJ, Hultgren SJ. Uropathogenic Escherichia coli superinfection enhances the severity of mouse bladder infection. PLoS Pathog. 2015 Jan 8; 11(1):e1004599. [DOI:10.1371/journal.ppat.1004599] [PMID] [PMCID]

9. Abe CM, Salvador FA, Falsetti IN, Vieira MA, Blanco J, Blanco JE, Blanco M, Machado AM, Elias WP, Hernandes RT, Gomes TA. Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic E. coli. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008 Apr; 52(3):397-406. [DOI:10.1111/j.1574-695X.2008.00388.x] [PMID]

10. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

11. Tajbakhsh E, Ahmadi P, Abedpour-Dehkordi E, Arbab-Soleimani N, Khamesipour F. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic E. coli isolated from clinical samples in Iran. Antimicrob Resist Infect Control. 2016 Apr 1;5:11. [DOI:10.1186/s13756-016-0109-4] [PMID] [PMCID]

12. Daigle F, Harel J, Fairbrother J M, Lebel P. Expression and detection of pap, sfa, and afa-encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic Escherichia coli.Clin.J Microbial.1994; 40: 286-91. [DOI:10.1139/m94-046] [PMID]

13. Mansouri M, Abbasi S. Prevalence of multiple drug-resistant clinical isolates of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in southeast Iran. IJMS.2010; 35(2): 101-108.

14. Mathai E, Chandy S, Thomas K, Antoniswamy B, Joseph I, Mathai M, Sorensen TL, Holloway K. Antimicrobial resistance surveillance among commensal Escherichia coli in rural and urban areas in Southern India. Trop Med Int Health. 2008 Jan; 13(1):41-5. [DOI:10.1111/j.1365-3156.2007.01969.x] [PMID]

15. Abdollahi Kheirabadi S, Najafipour S, Kafilzadeh F, Abdollahi A, Jafari S, Moravej A. Evaluation of Drug Resistance Pattern of Escherichia coli Strains Isolated from Fasa Vali-e-Asr Hospital Patients. J Fasa Univ Med Sci. 2013; 2(4): 273-278.

16. Milani M, Nahaei M R, Lotfipour F, Yousefee S. Antibiotic sensitivity of prevalent Bacteria isolated from urinary tract infection during 1998-2005. Pharm Sci. 2008; 4: 47-53.

17. Eslami G, Seyedjavadi S S, Goudarzi H, Fallah F, Goudarzi M. Distribution of Integrons among Multidrug-Resistant E. coli and Klebsiella Strains. J Res Med Sci. 2010; 34 (1):61-65. URL: http://pejouhesh.sbmu.ac.ir/article-1-737-fa.html.

18. Molina-López J, Aparicio-Ozores G, Ribas-Aparicio RM, Gavilanes-Parra S, Chávez-Berrocal ME, Hernández-Castro R, Manjarrez-Hernández HÁ. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic Escherichia coli including O25-ST131 in Mexico City. J Infect Dev Ctries. 2011 Dec 13;5(12):840-9. [DOI:10.3855/jidc.1703] [PMID]

19. Mansouri M, Abbasi S. Prevalence of multiple drug-resistant clinical isolates of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in southeast Iran. IJMS.2010; 35(2): 101-108

20. Sevanan Murugan, Pongiya Uma Devi and Peedikayil Neetu. Antimicrobial Susceptibility Pattern of Biofilm Producing Escherichia coli of Urinary Tract Infections. Microbiol Curr Res. 2011; 4: 73-80. [DOI:10.3923/crb.2011.73.80]

21. Al-Ubaidy A, Al-Ibadi M. Detection of Urovirulence Genes (eae, E-hly, α-hly) of Uropathogenic Escherichia coli by Specific PCR. JoBRC. 2010; 4(1): 44-54.

22. Ponnusamy P, Natarajan V, Sevanan M. In vitro biofilm formation by uropathogenic Escherichia coli and their antimicrobial susceptibility pattern. Asian Pac J Trop Med. 2012 Mar; 5(3):210-3. [DOI:10.1016/S1995-7645(12)60026-1]

23. Katongole P, Nalubega F, Florence N C, et al. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility and virulence genes of Uropathogenic Escherichia coli isolated from clinical isolates in Uganda. BMC Infect Dis. 2020; 20: 453. [DOI:10.1186/s12879-020-05186-1] [PMID] [PMCID]

24. Tarchouna M, Ferjani A, Ben-Selma W, Boukadida J. Distribution of uropathogenic virulence genes in Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infection. IJID. 2013; 17(6): 450-453. [DOI:10.1016/j.ijid.2013.01.025] [PMID]

25. López-Banda D A, Carrillo-Casas E M, Leyva-Leyva M, Orozco-Hoyuela G, Manjarrez-Hernández Ál H, Arroyo-Escalante S, et al. Identification of Virulence Factors Genes in Escherichia coli Isolates from Women with Urinary Tract Infection in Mexico. Biomed Res Int. 2014; 2014: Article ID 959206, 10 pages. [DOI:10.1155/2014/959206] [PMID] [PMCID]

26. Najafi A, Hasanpour M, Askary A, Aziemzadeh M, Hashemi N. Distribution of pathogenicity island markers and virulence factors in new phylogenetic groups of uropathogenic Escherichia coli isolates. Folia Microbiol (Praha). 2018 May;63(3):335-343. [DOI:10.1007/s12223-017-0570-3] [PMID]

27. Asadi S, Kargar M, Solhjoo K, Najafi A, Ghorbani-Dalini S. The Association of Virulence Determinants of Uropathogenic Escherichia coli With Antibiotic Resistance. Jundishapur J Microbiol. 2014 May;7(5):e9936. doi: 10.5812/jjm.9936. Epub 2014 May 1. [DOI:10.5812/jjm.9936] [PMID] [PMCID]

28. Abe CM, Salvador FA, Falsetti IN, Vieira MA, Blanco J, Blanco JE, et al. Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic E. coli. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008 Apr;52(3):397-406. [DOI:10.1111/j.1574-695X.2008.00388.x] [PMID]

29. Grude N, Srand L, Mykland H, Nowrouzian FL, Nyhus J, Jenkins A, et al. Fluoroquinolone resistant Uropathogenic Escherichia coli in Norway: evidence of clonal spread. Clin microbial and Infect2008; 14(5): 498-500. [DOI:10.1111/j.1469-0691.2008.01952.x] [PMID]

30. Tiba MR, Yano T, Leite DDS. Genotypic characterization of virulence factors in Escherichia coli strains from patients with cystitis. Rev Inst Med Trop. 2008; 50(5)255-60. [DOI:10.1590/S0036-46652008000500001] [PMID]

31. Arisoy M, Ayser D, Ekim M, Ozel D, Kose S K, Ozsoy E D, et al. Detection of virulence factors of E.coli from children by Duplex PCR. Int J Clin Pract. 2005; 60: 170-73. [DOI:10.1111/j.1742-1241.2005.00668.x] [PMID]

32. Fathollahi S, Yousefi-Mashouf R, Taghi Goodazi M, Hajilooe M, Hemati S, Mostafaei A, et al. Typing of the uropathogenic E.coli strains using O-serotyping and detection of pap adhesion-encoding operon by a polymerase chain reaction. Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases. 2009; 4(2): 77-81.

33. karimian A, Momtaz H, Madani M. Detection of uropathogenic Escherichia coli virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. African J Microbiol. Res. 2012; 6(39):6811-6816. [DOI:10.5897/AJMR12.1462]

34. Bahalo S, Tajbakhsh E, Tajbakhsh S, Momeni M, Tajbakhsh F. Detection of some virulence factors of Escherichia coli isolated from urinary tract infection isolated of children in Shahrekord Iran by Multiplex PCR. Middle-East J Scien Res. 2013;14(1):29-32.

35. Mohajeri P, Khademi H, Ebrahimi R, Farahani A, Rezaei M. Frequency distribution of virulence factors in uropathogenic Escherichia coli isolated from Kermanshah in 2011-2012. Int J Appl Basic Med Res. 2014; 4(2):111-6. [DOI:10.4103/2229-516X.136794] [PMID] [PMCID]

36. Zamani H, Salehzadeh A. Biofilm formation in uropathogenic Escherichia coli: association with adhesion factor genes. Turk J Med Sci. 2018 Feb 23;48(1):162-167. [DOI:10.3906/sag-1707-3] [PMID]