



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

مریم نیک زاد<sup>۱</sup>، رضا میرنژاد<sup>۲</sup>، ابراهیم باباپور<sup>۳\*</sup>

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.

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**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 میکروتیتراپلیت 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 را دارند. همچنین فراوانی ژن‌های *papC* و *sfa* کدکننده پیلی نیز در این جدایه‌ها می‌تواند به‌عنوان یکی از عوامل اتصال این باکتری‌ها عمل کند.

**کلیدواژه‌ها:** اشریشیا کلی یوروپاتوژن، بیوفیلم، Duplex PCR

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

### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۶

پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۰

انتشار آنلاین: ۱۴۰۰/۰۱/۲۰

موضوع: باکتری‌شناسی پزشکی

### نویسنده مسئول:

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

ایمیل:

[e.babapour@kiauo.ac.ir](mailto:e.babapour@kiauo.ac.ir)

### مقدمه

دیگر میزبان ایجاد کنند. این سویه‌های پاتوژن به‌طور گسترده به‌عنوان اشریشیا کلی اسهال‌زا 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 ویروالانس مختلف برای کلونیزه شدن در دستگاه ادراری برتری کسب می‌کنند (۱، ۲، ۳). سویه‌های UPEC می‌توانند در مجاری ادراری و در مثانه

اشریشیا کلی، شایع‌ترین عامل عفونت‌های ادراری در انسان است. جایگاه اکولوژیک، توانایی اتصال و مقاومت در برابر خاصیت شویندگی ادرار و تشکیل بیوفیلم، از جمله 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

مؤثر در درمان اولیه عفونت‌های ادراری و ایجاد مقاومت‌های نوظهور در این پاتوژن شایع عفونت ادراری، می‌تواند در کنترل عفونت‌های ادراری بسیار، با اهمیت باشد؛ بنابراین با توجه به مطالب ذکر شده این تحقیق با اهداف، تعیین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *شریشیا کلی* عامل عفونت‌های مجاری ادراری، بررسی قدرت تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش میکروتیتربلیت و بررسی ژن‌های فیمبریه‌ای *papC* و *sfa* با استفاده روش Duplex PCR و ارتباط بین آن‌ها انجام شد.

### مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت 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 نمونه ادرار از خانم‌های باردار مشکوک به عفونت دستگاه ادراری (UTI)، از مراکز بهداشت جامع سلامت شهرستان کرج جمع‌آوری گردید و سپس به منظور جداسازی *شریشیا کلی* و اطمینان از خالص بودن نمونه‌ها، هر کدام از نمونه‌ها به طور 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 *شریشیا کلی* تأیید شد.

#### تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن

برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی *شریشیا 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 جدایه‌های *شریشیا کلی* نسبت به شش آنتی‌بیوتیک از کلاس‌های مختلف، شامل آمپی‌سیلین ۱۰ μg (AM)، کوتریموکسازول ۲۵ μg (SXT)، سیپروفلوکساسین ۵ μg (CP)، جنتامایسین ۱۰ μg (GM)، نیتروفوران‌توئین ۳۰۰ μg (FM) و آمیکاسین ۳۰ μg (AN) تهیه شده از شرکت پاتن طب و با روش انتشار دیسک در محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک المان) و بر اساس دستورالعمل (CLSI 2017) انجام گردید؛ و از سویه‌ی رفرنس *شریشیا کلی* ATCC 25922 برای کنترل دیسک‌های آنتی‌بیوگرام استفاده شد (۱۰).

#### بررسی تشکیل بیوفیلم UPEC با روش میکروتیتربلیت

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

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 *شریشیا کلی* یوروپاتوژن دخیل هستند (۳).

بیوفیلم‌ها مجموعه‌ای از سلول‌های میکروبی هستند که به طور برگشت‌ناپذیر به سطح وابسته‌اند و به وسیله 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 *شریشیا کلی* از حالت غیر متصل به حالت متصل می‌شود (۵).

بیش از ۵۰٪ همه عفونت‌های باکتریایی گزارش شده 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 یوروپایی تلیال به باکتری اجازه می‌دهد تا در مقابل عملکرد تخلیه مثانه و فعال شدن مسیرهای انتقال پیام در میزبان مقاومت کند. از این رو، اتصال باکتری به سلول‌های یوروپایی تلیال یک مرحله مهم برای شروع و گسترش عفونت مجاری ادراری است، زیرا برخلاف سایر باکتری‌ها، این باکتری‌ها، به سرعت شسته نمی‌شوند (۷). این اتصال به واسطه یکی از آدهسین‌های 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 آدهسینی مهم در رابطه با این موضوع فیمبریه S است که توسط ژن *sfa* یا *S fimbrial adhesion* کد می‌شود. ژن‌های فوق از نوع آدهسین‌های 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 *شریشیا کلی*‌های جدا شده از عفونت ادراری هستند که می‌توانند به اتصال این باکتری به بافت‌های میزبانی و تشکیل بیوفیلم‌های 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 *شریشیا کلی* در جدایه‌های به دست آمده از عفونت‌های ادراری در سطح کشور، در راستای شناخت داروهای

گرفت و سپس با ۱۶۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳٪ حجمی/حجمی به‌عنوان حلال پر کرده، بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس جذب نوری چاهک‌های رنگ‌شده با کریستال ویوله، با طول موج 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)

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

جدول ۱. تقسیم‌بندی باکتری‌ها بر اساس قدرت تشکیل بیوفیلم در روش میکروتیتربلیت

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 طول موج ۵۷۰ نانومتر

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

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 دمای ۷۲°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)، SPSS 2016 (SPSS Inc., Microsoft, Washington D.C, USA) 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.

### 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 تأیید وجود

ژن‌های *papC* و *sfa* در جدایه های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر DNA هدف (۲۰-۱۰ ng/μL)، ماسترمیکس رنگی 2X از شرکت سینا کلون، ۱ μL از پرایمرهای رفت و برگشت (۲۰ پیکومول-) *PapC* F 5' و *PapC* R 5'- GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG-3' و *sfa* F 5'- ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA-3' و *sfa* R 5'- CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC-3' (CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA-3' و ۹/۵ μL آب مقطر دو بار تقطیر و هر برنامه PCR شامل ۳۰ چرخه تکثیر و تحت

## یافته ها

نتایج حاصل تست آنتی بیوگرام با استفاده از روش Kirby - Bauer نشان داد از مجموع ۶۴ جدایه JUEPC، جدا شده از نمونه های عفونت ادراری ۲۰ جدایه (۳۱٪) مقاوم به آمپی سیلین (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 نیتروفوران توئین (FM) و ۲ جدایه (۳/۱٪) به آمیکاسین (AN) مقاومت بودند (جدول ۲).

### جمع آوری، جداسازی و خالص سازی:

بر اساس نتایج حاصل از آزمایشات بیوشیمیایی و میکروسکوپی ۶۴ نمونه از ۱۰۰ از نمونه اخذ شده از بیماران مشکوک به عفونت ادراری آلوده به /شیریشیا کلی (۶۴٪) بودند.

### نتایج تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی:

جدول ۲. نتایج حاصل از تست تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی با روش کربی - بائر

مقاوم (%)	نیمه حساس (%)	حساس (%)	دیسک های آنتی بیوتیک
۲۰ (۳۱/۲)	۴ (۶/۲)	۴۰ (۶۲/۶)	آمپی سیلین ۱۰ میکروگرم (AM)
۲۶ (۴۰/۶)	.	۳۸ (۵۹/۴)	کوتریموکسازول ۲۵ میکروگرم (SXT)
۸ (۱۲/۵)	.	۵۶ (۸۷/۵)	سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم (CP)
۵ (۷/۸)	.	۵۹ (۹۲/۲)	جنتامایسین ۱۰ میکروگرم (GM)
۳ (۴/۶)	.	۶۱ (۹۵/۴)	نیتروفوران توئین ۳۰۰ میکروگرم (FM)
۲ (۳/۱)	.	۶۲ (۹۶/۹)	آمیکاسین ۳۰ میکروگرم (AN)

گردید که ۱۵ جدایه (۲۳/۴۴٪) دارای ژن *papC* و ۱۰ جدایه (۱۵/۶۲٪) دارای ژن *sfa* بودند و تعداد ۹ جدایه (۱۴/۰۶٪) به طور هم زمان دارای ژن های *sfa* و *papC* هستند (شکل ۱). همچنین از بین ۱۵ جدایه /شیریشیا کلی که دارای ژن *papC* بودند، ۱۴ جدایه (۹۳/۳٪) توانایی تشکیل بیوفیلم را دارا بودند و از ۱۰ جدایه /شیریشیا کلی یوروپاتوژن جدایه شده ای که دارای ژن *sfa* بودند، همگی (۱۰۰٪) دارای توانایی ایجاد بیوفیلم را بودند و تمام ۹ جدایه که دارای هر دو ژن مورد مطالعه به طور هم زمان بودند همگی دارای توانایی ایجاد بیوفیلم نیز بودند. نتیجه این مطالعه نشان داد که ژن *papC* در بین جدایه های مورد مطالعه، فراوانی بیشتری دارد. درصد حضور ژن های *papC* و *sfa* این باکتری ها و درصد توانایی ایجاد بیوفیلم، در جدول شماره ۳، نشان داده شده است. بررسی نتایج در خصوص رابطه بین وجود ژن *papC* و توانایی تشکیل بیوفیلم نشان داد که مقدار  $P\text{-value} = ۰/۳۶$  است که چون بالاتر از ۰/۵ است، نشان دهنده عدم ارتباط معنی دار بین حضور ژن *papC* و تشکیل بیوفیلم است ولی با توجه به اینکه ضریب Cramér's V برابر ۰/۲۲۴ بود، نشان می داد که ارتباط ضعیفی بین متغیرها وجود دارد. در خصوص رابطه بین وجود ژن *sfa* و توانایی تشکیل بیوفیلم نیز، مقدار  $P\text{-value} = ۰/۶۲۴$  بود که بالاتر از ۰/۵ است و نشان دهنده

### نتایج تست تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیتر پلیت:

نتایج حاصل از بررسی نشان داد که از ۶۴ جدایه مورد مطالعه ۳۱ جدایه (۴۸/۴٪) با توان بالا ۱۰ جدایه (۱۵/۶٪) با توان متوسط و ۱۴ جدایه (۲۱/۸٪) به طور ضعیف دارای قدرت تشکیل بیوفیلم بودند و فقط ۹ جدایه (۱۴/۲٪) فاقد قدرت تولید بیوفیلم بودند. به عبارتی ۸۵/۸٪ از کل جدایه ها توان تشکیل بیوفیلم را دارا بودند. نتایج نشان داد که باکتری های 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 آنتی بیوتیکی بیشتری برخوردار بودند، ولی ارتباط معنی داری بین مقاومت دارویی و تشکیل بیوفیلم ( $P \leq ۰/۰۵$ ) مشاهده نشد.

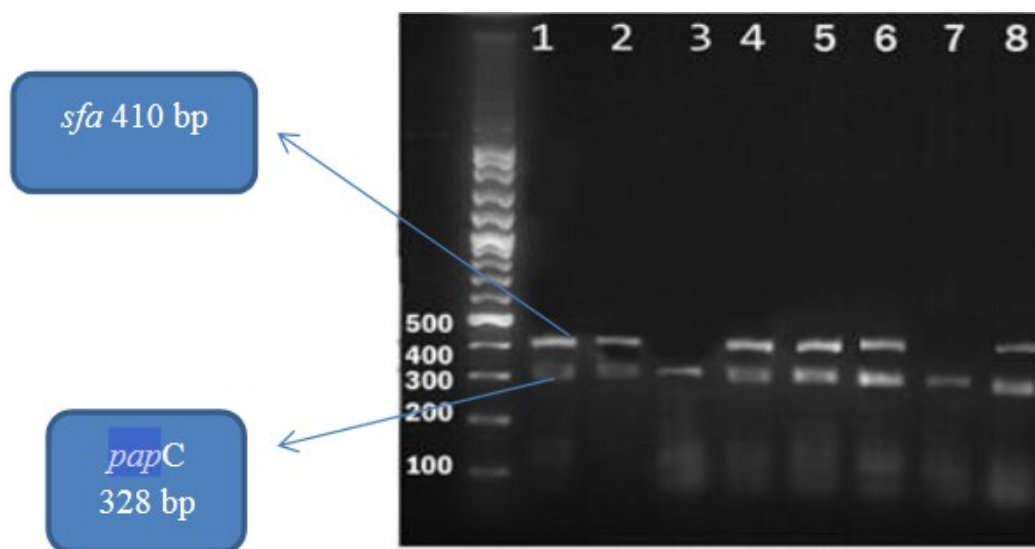
### نتایج بررسی وجود ژن های *papC* و *sfa* در جدایه های

#### /شیریشیا کلی یوروپاتوژن از Duplex PCR:

آشکارسازی ژن های *papC* و *sfa* با استفاده از تکنیک Duplex PCR انجام شد.

با انجام واکنش Duplex PCR بر روی DNA های استخراج شده از /شیریشیا کلی های جدا شده در این تحقیق مشخص

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 *sfa* (410 bp) و *papC* (328 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 میکروتیتراپل و فراوانی ژن‌های *sfa* و *papC*

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

## بحث

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 *sfa* و *pap* شایع‌ترین ژن‌های کدکننده پیلی در *اشریشیا کلی‌های* جداشده از عفونت ادراری هستند که می‌توانند به اتصال این باکتری به بافت‌های میزبانی و تشکیل بیوفیلم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک کمک کنند. شناسایی سوبه‌های UPEC تولیدکننده

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 به سرعت شسته

اشریشیا کلی‌های جدا شده 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 جدا شده از افراد مبتلا به 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 مورد مطالعه 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 با مطالعه حاضر از مقاومت بالاتری برخوردار است (۱۹)؛ که این می‌تواند به علت تفاوت مناطق جغرافیایی و منابعی باشد که باکتری از آن‌ها جدا شده است.

یکی از عواملی که در پاتوژن 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 میکروتیتراپلیت که یک روش کیفی استاندارد محسوب می‌شود مورد بررسی قرار گرفت (۴).

در این بررسی ۴۸/۴٪ از جدایه‌ها از نظر 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 با قدرت بالا،

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 جدایه‌های 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 با اهمیت باشد. اگرچه در مناطق مختلف ایران بر روی سویه‌های اشریشیا کلی جدا شده از عفونت ادراری مطالعاتی انجام شده 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 ذکر شده 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 جمع‌آوری شده 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 اخذ شده 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 مورد بررسی 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).

اشریشیا کلی‌های جدا شده در این بررسی، بیشترین حساسیت را نسبت به آمیکاسین (۹۶/۹٪) نشان دادند که با مطالعه Abdollahi Kheirabadi و همکاران، در سال ۲۰۱۲ که حساسیت

۲۰۰۸ بر روی ۳۰ نمونه /شریشیا کلی یوروپاتوژنیک مقاوم به فلوروکینولون‌ها در نروژ مشخص شد که فراوانی ژن‌های *pap* و *sfa* به ترتیب ۰/۲۷٪ و ۰٪ است (۲۹). در مطالعه Tiba و همکاران، نیز که در سال ۲۰۰۸ و بر روی ۱۶۲ جدایه /شریشیا 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 /شریشیا 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 جدایه /شریشیا کلی جدا شده از اشکال مختلف عفونت ادراری انجام شد، شیوع اپران *pap* را ۶۱٪ گزارش شد (۳۲). در تحقیق Karimian و همکاران، از ۱۲۳ جدایه /شریشیا 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 مشخص شده 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 ذکر شده نیز وجود دارد که ممکن است به دلیل تفاوت در تعداد جدایه‌ها، نوع نمونه‌ها و محل جمع‌آوری، نوع پرایمر و حتی پروتکل مورد استفاده برای انجام PCR باشد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۸ توسط Zamani و همکاران که بر روی UPEC انجام شد، ارتباط بین قدرت تشکیل بیوفیلیم و ژن‌های دخیل در اتصال مورد ارزیابی قرار گرفت و در آن گزارش گردید که بین *sfaS* و توانایی تشکیل بیوفیلیم، در جدایه‌های تولیدکننده بیوفیلیم‌های متوسط تا قوی، ارتباط وجود دارد، ولی بین وجود ژن *papC* و توانایی تشکیل بیوفیلیم ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (۳۶). همچنین در مطالعه Katongole و همکاران، مشخص شد که ۵۰٪ از جدایه‌های حاوی ژن *papC* توانایی تشکیل بیوفیلیم رادارند ولی ۵۳/۸٪ از جدایه‌های حاوی ژن *sfa* قابلیت تولید بیوفیلیم را داشتند (۲۳). نتایج مطالعه حاضر نیز همچنین نشان داد، از بین ۱۵ جدایه /شریشیا کلی که دارای ژن *papC* بودند، ۱۴ جدایه (۹۳/۳٪) و از ۱۰ جدایه /شریشیا کلی که دارای ژن *sfa* بودند، همگی (۱۰۰٪) دارای توانایی ایجاد بیوفیلیم را بودند و تمام ۹ جدایه که دارای هر دو ژن مورد مطالعه به‌طور هم‌زمان بودند همگی دارای توانایی ایجاد

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

در این مطالعه از روش Duplex PCR، برای بررسی حضور ژن‌های ویروالانس *papC* و *sfa* /شریشیا کلی استفاده شد. در این مطالعه مشخص گردید ۱۵ جدایه (۲۳/۴٪) از ۶۴ جدایه ی مورد مطالعه، 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، فراوانی ژن *papC* و *sfa* به ترتیب ۲۲٪ و ۱۳٪ گزارش گردید (۲۳). در مطالعه Tarchouna و همکاران، میزان فراوانی *papC* ۴۱٪ و فراوانی ژن *sfa/foc* ۳۴٪ گزارش شد (۲۴). در مطالعه‌ای که López-Banda و همکاران، در مکزیک و بر روی ۱۰۸ ایزوله /شریشیا کلی جدا شده از زنانی که دارای عفونت ادراری بودند، ژن‌های بیماری‌زا و مقاومت دارویی در گروه‌های فیلوژنیک مورد بررسی قرار گرفت و در آن فراوانی ژن *sfaS*، ۱/۱۹٪ و فراوانی 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*، ۳۸/۰۶٪ و فراوانی ژن *sfa/foc*، ۰/۰۷٪ گزارش گردید (۲۶). در مطالعه Asadi و همکاران، در ۲۰۱۴ فراوانی ژن *papC*، ۵۳/۰۳٪ بود (۲۷). در مطالعه‌ای که Abe et al در سال ۲۰۰۸، در برزیل بر روی ۲۲۵ /شریشیا 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

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 میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

### تعارض در منافع

بین نویسندگان مقاله هیچ‌گونه تعارض منافی 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 انجام شده است.

بیوفیلم بودند. اگرچه، این نتایج نشان‌دهنده نقش این ژن‌ها در ایجاد بیوفیلم است؛ اما با این حال و در کل، بررسی آماری نشان داد تا سطح ( $P \leq 0.05$ ) 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 با وجود توانایی ایجاد بیوفیلم فاقد ژن‌های فوق بودند و یا با وجود اینکه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین جدایه‌هایی که دارای توانایی بیوفیلم، بیشتر بود، ولی تعداد قابل توجهی هم با وجود توانایی تولید بیوفیلم به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی 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 از جمله 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 (از جمله 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، 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

### Referance

- 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]
- Johnson D E, Lockett 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]
- 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]
- 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]
- 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](https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002230)] [[PMID](#)]
7. Usein CR, Damian M, Tatu-Chitoiu D, Capusa C, Fagaras R, Tudorache D, Nica M, Le Bouguéne 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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, Hernandez 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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 Microbiol*. 1994; 40: 286-91. [[DOI:10.1139/m94-046](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.3923/crb.2011.73.80)]
21. Al-Ubaidy A, Al-Ibadi M. Detection of Urovirulence Genes (eae, E-hly,  $\alpha$ -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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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 Á 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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1007/s12223-017-0570-3)] [[PMID](#)]
27. Asadi S, Kargar M, Solhjo 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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00388.x)] [[PMID](#)]
29. Grude N, Strand 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 Infect* 2008; 14(5): 498-500. [[DOI:10.1111/j.1469-0691.2008.01952.x](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2005.00668.x)] [[PMID](#)]
32. Fathollahi S, Yousefi-Mashouf R, Taghi Goodazi M, Hajiloee 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.3906/sag-1707-3)] [[PMID](#)]