Archive of SID

فراوانی سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در اصفهان در سال ۱۳۹۶

علی قاسمی[۱]، فاتح رحیمی[۲]*، محمد کتولی[۳]

۱- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۲- دکتری تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۳- دکتری تخصصی میکروبیولوژی، استاد مرکز تحقیقات ژن اکولوژی، دانشکده بهداشت و علوم ورزشی، دانشگاه سان شاین کوست استرالیا

***نشانی برای مکاتبه: : f.rahimi@sci.ui.ac.ir**

دریافت مقاله: خرداد نود و نه پذیرش برای چاپ: خرداد نود و نه

چکیده

سابقه و هدف: *عفونت دستگاه ادراری یکی از شایعترین عفونتها و از مهمترین دلایل مرگ و میر در انسان به شمار می رود که باعث ابتلای افراد در همه سنین و صرف هزینه های سنگین مراقبتهای بهداشتی می شود. سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک عامل اصلی عفونتهای دستگاه ادراری به شمار می روند که به علت مقاومت در برابر اغلب آنتی بیوتیکها، درمان این عفونتها اغلب با شکست مواجه می شود. اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک واجد طیف وسیعی از عوامل حدت مختلف از جمله توانایی تشکیل بیوفیلم است. تشکیل بیوفیلم توسط اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک در سطح و یا داخل سلولهای اپیتلیال مثانه و همچنین بر روی سوند¬های ادراری از دلایل اصلی ایجاد عفونتهای پایدار است که منجر به عود عفونت می شود. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی سویه های اشرشیا کلای مولد بیوفیلم در بیماران مبتلا به عفونت ادراری در اصفهان انجام گرفته است.*

روش کار: *جهت انجام این مطالعه در طی سال ۱۳۹۶، در مجموع ۲۱۳ جدایه اشرشیا کلای از افراد مبتلا به عفونت ادراری در یک بیمارستان مرجع در اصفهان جمع آوری و مورد مطالعه قرار گرفت. شناسایی جدایه ها با استفاده از آزمونهای تشخیصی بیوشیمیایی و تأییدی PCR صورت گرفت. به منظور ارزیابی تولید سلولز و کورلای در میان سویه ها از آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو استفاده شد و با استفاده از روش میکروتیتریلیت، توانایی تولید بیوفیلم به صورت کمّی مورد سنجش قرار گرفت.*

یافته ها: *در مجوع با استفاده از آزمون PCR، ۱۶۶ سویه به عنوان اشرشیا کلای مورد شناسایی و تأیید قرار گرفتند. براساس نتایج آزمون ژلوز قرمز کنگو، ۱۲۷ سویه (۷۷ درصد) واجد مورفوتایپ saw و فاقد توانایی تولید کورلای و سلولز بودند و ۳۹ سویه (۲۳ درصد) قادر به تولید کورلای و سلولز بودند و به عنوان بیوفیلم مثبت شناسایی شدند؛ که در میان آنها، ۳۸ درصد واجد مورفوتایپ rdar، ۵۹ درصد واجد مورفوتایپ bdar و ۳ درصد نیز واجد مورفوتایپ pdar بودند. نتایج آزمون میکروتیترپلیت نشان داد که تمامی ۳۹ سویه تولید کننده کورلای و سلولز، بیوفیلم مثبت بودند که ۱۸، ۲۶ و ۵۶ درصد سویه ها به ترتیب واجد توانایی تولید بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف بودند.*

نتیجه گیری: *نتایج این مطالعه حاکی از شیوع بالای عفونت ادراری وابسته به اشرشیا کلای در جنسها و گروههای سنی مختلف در شهر اصفهان است. تولید بیوفیلم ارتباط تنگاتنگی با مقاومت ضدمیکروبی دارد و در حال حاضر، سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم یک نگرانی مهم در بهداشت عمومی جهان محسوب می شوند. تمامی سویه های مولد بیوفیلم قوی، توانایی تولید همزمان کورلای و سلولز را داشتند که نشان دهنده نقش مهم این دو ترکیب در شدت تشکیل بیوفیلم است. بنابراین، ارائه راهکارهای درمانی جدید و ترکیبات قدرتمند در جهت تخریب یا مهار کورلای و سلولز، نقش بسزایی در حل مشکلات بالینی ناشی از بیوفیلم اشرشیا کلای خواهد داشت.*

واژگان کلیدی: عفونت مجاری ادراری، اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک، بیوفیلم، کورلای، سلولز، مورفوتایپ

مقدمه

عفونت بیمارستانی عبارت است از عفونت کسب شده در بیمارستان، توسط بیماری که به دلیلی به جز مشکل عفونت، بستری گردیده است، یا عفونت ایجاد شده در فرد بیماری که ۷۲-۴۸ ساعت در بیمارستان یا سایر مراکز بهداشتی درمانی بستری گردیده ولی در زمان پذیرش، مبتلا به عفونت نبوده و یا در دوره کمون بیماری قرار نداشته است. فراوانی عفونت بیمارستانی در میان بیماران بستری، براساس گزارشات سازمان بهداشت جهانی به طور متوسط ۸/۷ درصد می باشد. این عفونتها از عوامل عمدهٔ مرگ و میر بیماران در مراکز درمانی بوده و هزینه های قابل‌توجهی را بر بیمار و سیستم بهداشت و درمان تحمیل می نمایند (۱, ۲). عوامل متعددی مانند افزایش انواع روشهای پزشکی و تکنیکهای تهاجمی که خود بالقوه ایجادکننده عفونت می باشند،

www.SID.ir

Archive of SID

منجر به انتشار عفونت در میان بیماران بستری شده می شود. همچنین انتشار باکتریهای مقاوم به دارو در میان جمعیت ساکن در بیمارستانها و عدم رعایت صحیح اصول بهداشتی را می توان از عوامل عمده این موضوع دانست (۳).

عفونت دستگاه ادراری از مهمترین انواع عفونتهای بیمارستانی و دومین عفونت شایع در انسان محسوب می شود. اگرچه عفونت دستگاه ادراری نسبت به سایر عفونتهای بیمارستانی عوارض کمتری ایجاد می نماید، اما در موارد شدید منجر به ایجاد باکتریمی و حتی مرگ می شود (۴). اگرچه انواع مختلفی از میکروارگانیسمها مانند باکتریها، ویروسها و قارچها توانایی ایجاد عفونت ادراری را دارند؛ اما باکتری *اشرشیا کلای* که یک باکتری کامنسال در انسان و حیوانات است، از مهمترین عوامل ایجاد این عفونت محسوب می شود و تقریباً ۸۰ تا ۹۰ درصد عفونت دستگاه ادراری کسب شده در اجتماع (عفونتهای غیربیمارستانی) بهوسیله سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک ایجاد می‌شود. سایر باکتریهای گرم منفی از جمله سویه های *کلبسیلا نومونیه*، *سودوموناس آئروژینوزا* و گونه های *پروتئوس* نیز از عوامل مهم ایجاد عفونت دستگاه ادراری محسوب می گردند (۵).

سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک از طریق مجرای ادراری وارد مثانه شده و با طی مسیری به سمت کلیه ها حرکت می کنند. چنانچه قسمتهای تحتانی مجرای ادراری مانند میزنای و مثانه درگیر شود، عفونت را التهاب مثانه (سیستیت) گویند که بیمار از سوزش و درد هنگام خروج ادرار رنج می برد و در صورت آلوده شدن قسمتهای فوقانی، عفونت کلیه (پیلونفریت) به وجود می آید (۵). حضور ساختارهای اختصاصی با نقش اتصالی و توانایی تشکیل بیوفیلم، در بیشتر میکروارگانیسمها دیده می شود که این ویژگی باعث افزایش استقامت آنها به عوامل ضدمیکروبی مختلف و همچنین افزایش احتمال زنده ماندن و بقاء در جوامع و محیطهای گوناگون می شود. وجود این مقاومت بالا در باکتریهای تشکیل-دهنده بیوفیلم، باعث ماندگاری باکتری در بدن برای ماهها و یا حتی سالها شده که این خود منجر به عود عفونت و ایجاد عفونتهای مزمن مانند التهاب پایدار و آسیب بافتی می گردد (۶). تشکیل بیوفیلم در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک، یکی از مهم ترین عوامل بیماریزایی این باکتری محسوب شده و نقش بسیار مهمی در عفونتهای ادراری به ویژه عفونتهای پایدار و پروستاتیت حاد بازی می کند (۶).

بیوفیلم، اجتماع یا ماتریکس پیچیده ای از میکروارگانیسمها و تولیدات میکروبی آنها می باشد که به سطح زنده یا غیرزنده متصل شده است (۷). تشکیل بیوفیلم یک فرآیند فعال بوده و شامل اتصال اولیه، تشکیل میکروکلنی، تولید ماده پلیمریک خارج سلولی و به دنبال آن رشد، بلوغ و درنهایت کنده شدن و رهایی سلولها از بیوفیلم می باشد (۸). چندین عامل سطحی مانند تاژک، پیلی یا فیمبریه، پروتئینهای اتوترانسپورتر، تولید اگزوپلی‌ساکارید و ... در تشکیل بیوفیلم دخیل هستند،که در بین آنها فیمبریه کورلای و پلی ساکارید سلولز با داشتن خاصیت چسبندگی و همچنین مهار انتقال آنتی بیوتیک، نقش کلیدی در ارتباط با زنده ماندن *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک ایفا می کنند (۹).

به طور کلی باکتریهای تشکیل‌دهنده بیوفیلم در بیش از ۸۰ درصد از کل عفونتهای باکتریایی شرکت دارند. بیوفیلم تشکیل‌شده توسط *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک، علاوه بر اینکه از عوامل اصلی مقاومت باکتری در برابر مواد ضدمیکروبی مختلف و سیستم دفاعی میزبان می باشد، در پزشکی نیز باعث ایجاد مشکلات متعددی از جمله عفونت وسایل خارجی مانند سوندها، لوله های حلقی و لنزهای تماسی شده است (۱۰). به همین دلیل بررسی و تشخیص بیوفیلم در جدایه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک و استفاده از روشهای مناسب و سریع برای غربالگری سویه های تولیدکننده بیوفیلم ضروری است و می تواند به انتخاب راه درمانی مناسب و پیشگیری از عود عفونت کمک کند و از ایجاد مشکلات ادراری شدید مانند پیلونفریت و پروستاتیت جلوگیری نماید. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی جدایه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک تولیدکننده بیوفیلم جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در یک بیمارستان مرجع در شهر اصفهان طی سال ۱۳۹۶ به انجام رسیده است.

روش کار

در طی شهریور لغایت بهمن ۱۳۹۶، در مجموع تعداد ۲۱۳ جدایه *اشرشیا کلای* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونتهای ادراری در یک بیمارستان مرجع در اصفهان جمع آوری گردید. جداسازی جدایه ها از بیماران در هر دو جنس، گروه های سنی مختلف و بستری یا سرپایی (غیر بستری) صورت گرفت. گروه عفونت بستری شامل افراد بیمار بستری شده در بیمارستان بودند و افرادی که طی دو هفته قبل از پذیرش هیچ مراجعه ای به بیمارستانها یا سایر مراکز درمانی نداشتند، در گروه عفونت سرپایی قرار گرفتند. پلیتهای جمع آوری شده از آزمایشگاه بیمارستان به صورت هفتگی به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه اصفهان منتقل شده و بر روی محیط مک کانکی آگار (Merck, Germany) به صورت خطی کشت داده شدند. جدایه های با رنگ کلنی صورتی به عنوان سویه های مشکوک به *اشرشیا کلای* مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند. به منظور تأیید اولیه نتایج حاصل، این جدایه‌ها بر روی محیط ائوزین متیلن بلو آگار (Merck, Germany) کشت داده شدند و جدایه های با رنگ کلنی ارغوانی تیره و یا جلای سبز فلزی در ویالهای کرایو حاوی ۵۰ درصد محیط آبگوشت Brain Heart Infusion (BHI) (Scharlau, Spain) و ۵۰ درصد گلیسرول ذخیره شده و در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۱۱). شناسایی

www.SID.ir

Archive of SID

و تأیید نهایی جدایه ها با آزمون PCR و با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *tufA* صورت گرفت.

در این تحقیق، DNA استفاده شده در آزمون PCR جهت تکثیر ژن *tufA*، با روش جوشاندن براساس دستورالعمل Kai-Larsen استخراج گردید (۱۲). بر این اساس، یک کلنی از جدایه باکتریایی در میکروتیوب استریل واجد ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل و سپس به خوبی ورتکس گردید. میکروتیوب واجد باکتری حل شده، به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و سپس ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دور g ×۱۲۵۰۰، سانتریفیوژ گردید و سرانجام ۲ میکرولیتر از مایع رویی به عنوان DNA الگو جهت انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت.

جهت تأیید نهایی جدایه های *اشرشیا کلای* که بر روی محیط ائوزین متیلن بلو آگار واجد کلنیهای ارغوانی یا جلای سبز فلزی بودند، آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *tufA* (رمزکننده پروتئین عامل طویل‌کننده EF-TU) بر اساس پروتکل و چرخه حرارتی معرفی‌شده توسط Vareille و همکاران مورد استفاده قرار گرفت (۱۳). از سویه *اشرشیا کلای* ATCC 25922 نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

به منظور بررسی کیفی تشکیل بیوفیلم (تولید سلولز و کورلای) در ۱۶۶ جدایه تأیید شده *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، از آزمون ژلوز قرمز کنگو بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده شد (۱۴). برای این منظور، سویه های *اشرشیا کلای* به صورت خطی بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو کشت داده شدند و پس از ۷۲-۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، پلیتها جهت تعیین مورفولوژی هر یک از سویه ها مورد بررسی قرار گرفتند و بر اساس توانایی تولید کورلای و سلولز به ۴ مورفوتایپ radr (کلنی قرمز، خشک و خشن؛ مولد سلولز و کورلای)، bdar (قهوه ای، خشک و خشن؛ فقط مولد کورلای)، pdar (صورتی، خشک و خشن؛ فقط مولد سلولز) و saw (کلنی صاف و سفید؛ عدم تولید سلولز و کورلای) تقسیم‌بندی شدند. جدایه های با مورفوتایپ rdar، bdar و pdar به عنوان جدایه های تولیدکننده بیوفیلم و جدایه های با مورفوتایپ saw به عنوان بیوفیلم منفی در نظر گرفته شدند. تولید سلولز و کورلای برای هر جدایه در سه آزمایش جداگانه مورد بررسی قرا گرفت و از سویه *اشرشیا کلای* Nissle1917 که تولید-کننده سلولز و کورلای است، به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

بررسی کمّی تولید بیوفیلم با روش میکروتیترپلیت و بر اساس دستورالعمل Stepanovic و همکاران با اندکی تغییرات انجام گرفت (۱۵). برای این منظور، از کشت تازه هر جدایه باکتریایی بر روی محیط ژلوز LB (Scharlau, Spain) رقت ۱:۱۰۰ تهیه شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر سوسپاسیون باکتریایی به صورت سه تایی در میکروپلیت توزیع گردید و پلیت به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. در هر میکروپلیت، از چاهکهای حاوی محیط استریل و فاقد باکتری به عنوان کنترل منفی و از سویه *اشرشیا کلای* ATCC 10798 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پس از این مدت، محتویات چاهکها تخلیه و شستشو داده شده و با استفاده از کریستال ویوله (Merck, Germany) ۰/۳ درصد رنگ آمیزی شدند. پس از افزودن محلول اتانول-استون جذب نوری پلیتها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانشگر الایزا (Stat Fax 2100) ثبت گردید. میانگین جذب نوری سه حفره مربوط به هر جدایه (ODs) محاسبه گردید و با میانگین جذب نوری سه حفره کنترل (ODnc) مقایسه شدند. اگر 4ODnc<ODs بود به عنوان جدایه های مولد بیوفیلم قوی و اگر ODs<ODnc بود به عنوان جدایه های فاقد قدرت تولید بیوفیلم طبقه‌بندی شدند. تولید بیوفیلم متوسط و ضعیف نیز به ترتیب به صورت 2ODnc<ODs<4ODnc و ODnc<ODs<2ODnc بود.

به منظور انجام بررسیهای آماری و تجزیه و تحلیل داده های به دست آمده در طی آزمونهای مختلف و همچنین جهت رسم تمامی نمودارها از نرم‌افزار GraphPad Prism 5 استفاده گردید.

یافته ها

در فاصله شهریور لغایت بهمن ۱۳۹۶، تعداد ۲۱۳ جدایه *اشرشیا کلای* از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری در بیمارستان الزهراء (س) اصفهان جمع‌آوری گردید. شناسایی فنوتایپی جدایه ها با استفاده از محیطهای کشت انتخابی مک کانکی آگار و ائوزین متیلن بلو آگار انجام گرفت و ۱۶۶ جدایه به عنوان سویه های مشکوک به *اشرشیا کلای* انتخاب شدند. تأیید نهایی سویه‌ها به وسیله آزمون PCR و پرایمر اختصاصی ژن *tufA* انجام شد که با توجه به ایجاد باند ۲۰۰ جفت بازی حاصل از تکثیر این ژن، تمامی ۱۶۶ جدایه به عنوان سویه های *اشرشیا کلای* مورد تأیید قرار گرفتند.

بازه سنی بیماران مبتلا به عفونت ادراری در این مطالعه ۱ تا ۹۰ سال و میانگین سن افراد بیمار ۳۶ سال بود. بیشتر افراد بیمار متعلق به گروه کودکان دختر با محدوده سنی ۳ تا ۹ سال و گروه زنان مسن با محدوده سنی ۶۰ تا ۹۰ سال بود. از ۱۶۶ بیمار مبتلا به عفونت ادراری، ۱۰۸ نفر (۶۵ درصد) زن و ۵۸ نفر (۳۵ درصد) مرد بودند و در مجموع، ۱۱۸ بیمار (۷۱ درصد) بستری (شامل ۴۰ مرد و ۷۸ زن) و ۴۸ بیمار (۲۹ درصد) سرپایی (شامل ۱۸ مرد و ۳۰ زن) بودند (جدول ۱).

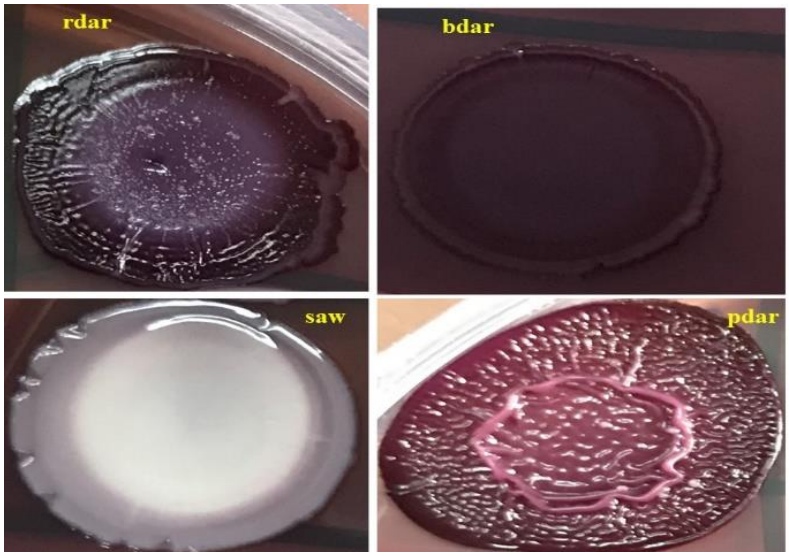
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- توزیع مبتلایان به عفونت دستگاه ادراری براساس سن و جنس. بیمارستان الزهراء (س) اصفهان۱۳۹۶

جنس / سن	مرد		زن		تعداد (درصد)
	بستری (درصد)	سرپایی (درصد)	بستری (درصد)	سرپایی (درصد)	
≤۲	۲ (۱۳)	۲ (۱۳)	۷ (۴۷)	۴ (۲۷)	۱۵ (۹)
۳-۹	۴ (۱۲)	۳ (۱۰)	۱۶ (۵۰)	۹ (۲۸)	۳۲ (۱۹)
۱۰-۳۴	۶ (۲۹)	۳ (۱۴)	۸ (۳۸)	۴ (۱۹)	۲۱ (۱۳)
۳۵-۵۹	۱۲ (۳۰)	۶ (۱۵)	۱۶ (۴۰)	۶ (۱۵)	۴۰ (۲۴)
≥۶۰	۱۶ (۲۸)	۴ (۷)	۳۱ (۵۳)	۷ (۱۲)	۵۸ (۳۵)
تعداد	۴۰ (۲۴)	۱۸ (۱۱)	۷۸ (۴۷)	۳۰ (۱۸)	۱۶۶

از ۱۶۶ سویه *اشرشیا کلای* شناسایی شده، ۳۹ سویه (۲۳ درصد) قادر به تولید سلولز و کورلای بودند و به عنوان سویه های بیوفیلم مثبت انتخاب شدند (شکل ۱). همچنین، ۱۲۷ سویه (۷۷ درصد) واجد مورفوتایپ saw بوده و قادر تشکیل بیوفیلم و تولید سلولز و کورلای نبودند. در میان سویه های بیوفیلم مثبت، ۱۵ سویه (۳۸ درصد) واجد مورفوتایپ rdar (مولد سلولز و کورلای)، ۲۳ سویه (۵۹ درصد) واجد مورفوتایپ bdar (فقط مولد کورلای) و ۱ سویه (۳ درصد) نیز واجد مورفوتایپ pdar (فقط مولد سلولز) بودند.



شکل ۱- مورفوتایپهای rdar، bdar، pdar و saw بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو.

www.SID.ir

Archive of SID

تجزیه و تحلیل آماری فراوانی مورفوتایپها در مردان و زنان، نشان دهنده ارتباط معنی دار میان مورفوتایپ rdar و عفونت ادراری در زنان (۱۳ سویه، ۸۷ درصد) ($P<۰/۰۰۰۱$) و همچنین شیوع بالاتر مورفوتایپ bdar در مردان (۱۲ سویه، ۵۲ درصد) ($P=۰/۰۶۵۷$) بود. همچنین تنها جدایه با مورفوتایپ pdar، مربوط به یک مرد ۵۷ ساله بستری بود. مقایسه شیوع مورفوتایپهای مختلف در گروه های سنی افراد بیمار، شیوع بالاتر موفوتایپهای rdar و bdar را به ترتیب در گروه سنی بالای ۶۰ سال (۵ سویه، ۳۳ درصد) و گروه سنی ۵۹-۳۵ سال (۶ سویه، ۲۶ درصد) نشان داد (جدول ۲).

جدول ۲- فراوانی انواع مورفوتایپها بر اساس جنس و سن بیماران مبتلا به عفونت ادراری. بیمارستان الزهراء (س) اصفهان. ۱۳۹۶

فراوانی / مورفوتایپها	rdar		bdar		pdar	
سن	مرد (درصد)	زن (درصد)	مرد (درصد)	زن (درصد)	مرد (درصد)	زن (درصد)
۲≤	۰	۳ (۶۰)	۱ (۲۰)	۱ (۲۰)	۰	۰
۳-۹	۰	۳ (۳۸)	۲ (۲۶)	۳ (۳۸)	۰	۰
۱۰-۳۴	۰	۲ (۲۹)	۲ (۲۹)	۳ (۴۲)	۰	۰
۳۵-۵۹	۱ (۱۱)	۱ (۱۱)	۴ (۴۵)	۲ (۲۲)	۱ (۱۱)	۰
۶۰≤	۱ (۱۰)	۴ (۴۰)	۳ (۳۰)	۲ (۲۰)	۰	۰
تعداد (درصد)	۲ (۵)	۱۳ (۳۳)	۱۲ (۳۱)	۱۱ (۲۸)	۱ (۳)	۰

در مجموع ۱۲۷ سویه (۷۷ درصد) بیوفیلم منفی بودند. در میان سایر ۳۹ سویه، ۷ سویه (۴ درصد) مولد بیوفیلم قوی، ۱۰ سویه (۶ درصد) مولد بیوفیلم متوسط و ۲۲ سویه (۱۳ درصد) مولد بیوفیلم ضعیف بودند. بر این اساس مشخص گردید که تمامی ۳۹ سویه بیوفیلم مثبت به روش کیفی ژلوز قرمز کنگو (تولید کننده سلولز و کورلای) در روش کمی میکروتیترپلیت نیز بیوفیلم مثبت بودند. سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم قوی از شیوع بالاتری در میان زنان در بازه سنی بالاتر از ۶۰ سال برخوردار بودند و ارتباط قابل توجهی نیز بین تشکیل بیوفیلم ضعیف با عفونت‌های مردان و محدوده سنی ۱۰ تا ۳۴ سال مشاهده شد (جدول ۳).

جدول ۳- توزیع فراوانی گروه های بیوفیلمی در مبتلایان به عفونت ادراری براساس سن. بیمارستان الزهراء (س) اصفهان. ۱۳۹۶

فراوانی / تشکیل بیوفیلم	بیوفیلم قوی		بیوفیلم متوسط		بیوفیلم ضعیف	
سن	مرد (درصد)	زن (درصد)	مرد (درصد)	زن (درصد)	مرد (درصد)	زن (درصد)
۲≤	۰	۱ (۲۰)	۰	۲ (۴۰)	۱ (۲۰)	۱ (۲۰)
۳-۹	۱ (۱۳)	۰	۰	۳ (۳۷)	۲ (۲۵)	۲ (۲۵)
۱۰-۳۴	۰	۰	۱ (۱۴)	۰	۴ (۵۷)	۲ (۲۹)
۳۵-۵۹	۱ (۱۱)	۱ (۱۱)	۰	۲ (۲۲)	۳ (۳۴)	۲ (۲۲)
۶۰≤	۰	۳ (۳۰)	۰	۲ (۲۰)	۲ (۲۰)	۳ (۳۰)
تعداد (درصد)	۲ (۵)	۵ (۱۳)	۱ (۳)	۹ (۲۳)	۱۲ (۳۰)	۱۰ (۲۶)

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج بررسی توانایی کمّی تولید بیوفیلم، هماهنگی و ارتباط مستقیمی با نتایج تولید سلولز و کورلای در روش قرمز کنگو نشان داد. بر این اساس مشخص گردید که تمام سویه های با مورفوتایپ rdar، bdar و pdar در گروه بیوفیلم مثبت و تمامی سویه های با مورفوتایپ saw نیز در گروه بیوفیلم منفی قرار داشتند. علاوه بر این، مقایسه توانایی کمی تولید بیوفیلم با موفوتایپهای مختلف، مؤید ارتباط قابل توجه بین گروه بیوفیلم قوی و متوسط با مورفوتایپ rdar بود؛ به طوریکه ۱۰۰ و ۶۰ درصد سویه های به ترتیب بیوفیلم قوی و متوسط واجد مورفوتایپ rdar (کورلای + و سلولز +) بودند. از طرف دیگر، ۸۶ درصد سویه های bdar و همچنین تنها جدایه pdar در گروه بیوفیلم ضعیف قرار داشتند (جدول ۴).

جدول ۴- توزیع فراوانی مورفوتایپ های rdar، bdar و pdar براساس گروه های بیوفیلمی در مبتلایان به عفونت ادراری. بیمارستان الزهراء (س) اصفهان. ۱۳۹۶

فراوانی / مورفوتایپ	rdar		bdar		pdar	
بیوفیلم	مرد (درصد)	زن (درصد)	مرد (درصد)	زن (درصد)	مرد (درصد)	زن (درصد)
بیوفیلم قوی	۲ (۲۹)	۵ (۷۱)	۰	۰	۰	۰
بیوفیلم متوسط	۰	۶ (۶۰)	۱ (۱۰)	۳ (۳۰)	۰	۰
بیوفیلم ضعیف	۰	۲ (۹)	۱۱ (۵۰)	۸ (۳۶)	۱ (۵)	۰
تعداد (درصد)	۲ (۵)	۱۳ (۳۳)	۱۲ (۳۱)	۱۱ (۲۸)	۱ (۳)	۰

بحث

اشرشیا کلای یک باکتری کامنسال در دستگاه گوارش اغلب پستانداران می باشد، اما سویه هایی از این باکتری در انسان علاوه بر بیماریهای روده ای عامل طیف وسیعی از عفونتهای خارج روده ای نیز به شمار می روند و به همین دلیل این باکتری یکی از معضلات بهداشتی جوامع انسانی محسوب می شود. از مهمترین خصوصیات این سویه ها، می توان به وجود مقاومت ذاتی یا اکتسابی نسبت به داروهای ضدمیکروبی و یا حضور عوامل حدت مختلف و به ویژه توانایی تشکیل بیوفیلم اشاره کرد. عفونت دستگاه ادراری از شایعترین عفونتهای باکتریایی در انسان به شمار می رود که باعث ابتلای افراد در سنین مختلف شده و سالیانه باعث ابتلای بیش از ۲۵۰ میلیون نفر در کشورهای در حال توسعه می شود (۱۶). دیابت، مشکلات دستگاه ادراری مانند انسداد مجاری ادراری، بزرگی پروستات و استفاده از سوندهای ادراری از جمله عوامل خطر مرتبط با عفونتهای ادراری محسوب می شوند که منجر به پیچیدگی عفونت و هزینه های بالای درمانی می شوند (۱۷). *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مسئول ۷۰ تا ۹۰ درصد عفونتهای مجاری ادراری است (۴). اغلب جدایه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک نسبت به آنتی بیوتیکهای رایج مصرفی در درمان عفونتهای ادراری مقاوم می باشند (۱۸). توانایی تشکیل بیوفیلم از مهمترین عوامل بیماریزایی *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک محسوب می شود که در ایجاد عفونت ادراری و همچنین مقاومت آنتی بیوتیکی نقش بسیار مؤثری ایفا می کند. عفونتهای ادراری ایجاد شده توسط *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک اغلب به صورت تک گیر بوده که با تشخیص صحیح و سریع قابل درمان می باشند، اما گاهی اوقات عفونتها به حالت عودشونده تبدیل شده که از دلایل اصلی آن تشکیل بیوفیلم و ماندگاری طولانی مدت باکتری در روند عفونت است. این عفونتهای عودشونده منجر به آسیبهای غیرقابل بازگشت و صرف هزینه های درمانی بسیار بالا می شوند که البته در بسیاری از موارد، درمان آنها نیز با شکست مواجه می شود (۱۹). قابلیت تشکیل بیوفیلم ارتباط تنگاتنگی با قدرت بیماریزایی سویه های *اشرشیا کلای* آلوده کننده مجاری ادراری دارد. در مطالعات زیادی اهمیت تشکیل بیوفیلم توسط *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک در عفونت مجاری ادراری و به

www.SID.ir

Archive of SID

خصوص در سیستیت مزمن و عفونتهای مرتبط با سوندها اثبات شده است (۱۰, ۲۰). در واقع اتصال باکتری به سلولهای اپیتلیوم مجاری ادراری، مرحله ضروری برای شروع و گسترش عفونت ادراری می باشد که باعث مقاومت باکتری در برابر جریان هیدرودینامیک ادرار و تخلیه مثانه و همچنین فعال شدن مسیرهای انتقال پیام در میزبان می شود. در این فرآیند، سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک انواع مختلفی از عوامل اتصالی را به منظور تشخیص و اتصال به گیرنده های مجاری ادراری به کار می گیرند که این عوامل اتصالی در تشکیل بیوفیلم نیز دخالت دارند (۲۱). در مطالعه Hung و همکاران در سال ۲۰۱۳ مشخص شد که ساختار بیوفیلم در *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک، بسیار منظم و در ترکیب با ماتریکسی پیچیده است که اجزاء مختلف این ماتریکس در قالب یک ساختار با موقعیتهای فضایی کاملاً دقیق و مجزا از هم قرار گرفته اند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی از بیوفیلم *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک، وجود لایه ای متراکم از فیبرهای ماتریکسی در بخش بیرونی و مجموعه ای از فیبرهای در هم تنیده در اطراف باکتری را نشان می دهد (۲۲). بررسی بیوشیمیایی ترکیب بیوفیلم مشخص کرد که کورلای (فیمبریه مجعد) جزء اصلی تشکیل دهنده بیوفیلم می باشد که همراه با آن سایر ترکیبات مانند سلولز، فلاژل و فیمبریه تایپ I باعث استحکام و حفظ ساختار سه‌بعدی بیوفیلم می شوند (۲۲). در مطالعه Mihaylova و همکاران در سال ۲۰۱۲ با استفاده از روشهای فنوتایپی و ژنوتایپی، شاخصهای بیماریزایی مختلفی مانند عوامل اتصالی، همولیزین و تشکیل بیوفیلم در ۱۲ سویه *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک جدا شده از افراد بیمار با درجات متفاوت عفونت ادراری مورد بررسی قرار گرفت و وجود فیمبریه کورلای به عنوان مهمترین عامل چسبندگی در اغلب این سویه ها مورد تأیید قرار گرفت (۲۳). تشکیل بیوفیلم منجر به مقاومت باکتری در برابر عوامل مختلف از جمله آنتی بیوتیکها و سیستم دفاعی میزبان و در نتیجه ایجاد عفونتهای مزمن مانند التهاب پایدار و آسیب بافتی می شود (۲۴). باکتری *اشرشیا کلای* از مهمترین عوامل ایجاد عفونتهای ادراری وابسته به سوند نیز می‌باشد و طی مطالعات مختلف به عنوان فراوانترین باکتری موجود در بیوفیلم سوندهای ادراری گزارش شده است (۱۶). به طور کلی باکتریهای تشکیل دهنده بیوفیلم در بیش از ۸۰ درصد از کل عفونتهای باکتریایی شرکت دارند. با توجه با مقاومت آنتی بیوتیکی بیوفیلم نسبت به حالت پلانکتونی، درمان عفونتهای حاصل از این باکتریها بسیار مشکل می باشد و به همین دلیل بررسی و تشخیص بیوفیلم و استفاده از روشهای مناسب و سریع برای غربالگری باکتریهای تولید کننده بیوفیلم ضروری است که می تواند به انتخاب راه درمانی مناسب و پیشگیری از عود عفونت کمک کند و از ایجاد مشکلات ادراری شدید مانند پیلونفریت و پروستاتیت جلوگیری نماید.

نتایج این تحقیق فراوانی بالای عفونتهای ادراری وابسته به *اشرشیا کلای* را نشان داد. طی مطالعات مختلف دیگر نیز باکتری *اشرشیا کلای* به عنوان شایعترین بیماریزای عامل عفونت ایجاد ادراری گزارش گردیده است (۲۷-۲۵). در این مطالعه، شیوع عفونت ادراری در زنان شایعتر از مردان بود که این اختلاف می تواند به دلیل تفاوت در آناتومی مجاری ادراری در زنان باشد و در سایر مطالعات نیز گزارش شده است (۲۸). شیوع عفونت در محدوده سنی بالای ۳۵ سال بیشتر بود و همچنین میانگین سنی افراد بیمار در این مطالعه بالا بود که این امر می تواند ناشی از وجود عوامل خطر عفونت ادراری در افراد مسن مانند ضعف سیستم ایمنی، انسداد مجاری ادراری، تخلیه ضعیف مثانه، استفاده از سوند و ابتلا به دیابت باشد (۲۹). از طرف دیگر افراد بیمار بستری شده در بیمارستان فراوانی بالاتری داشتند که وجود بیماریهای زمینه ای، استفاده از سوند و عدم رعایت نکات بهداشتی توسط این افراد و همچنین پرسنل درمانی می تواند به عنوان عوامل خطر مؤثر در ایجاد عفونت ادراری نقش داشته باشند. در این مطالعه، فراوانی سویه های تولیدکننده سلولز و کورلای ۲۳ درصد (۳۹ سویه) بود که در بین آنها، ۱۵ جدایه (۳۸ درصد) با تولید همزمان کورلای و سلولز و تشکیل کلنیهایی با مورفوتایپ توانایی بالایی در تولید بیوفیلم نشان دادند. به طور کلی rdar در این تحقیق با توجه به نتایج آزمون ژلوز قرمز کنگو، فراوانی سویه های تولیدکننده کورلای از سویه های واجد سلولز بالاتر و همکاران بر روی Bokranzبود که مشابه نتایج تحقیق جدایه های *اشرشیا کلای* ادراری بود (۳۰). نتایج فراوانی و rdarمورفوتایپها، وجود ارتباط معنی دار بین مورفوتایپ عفونت ادراری در زنان را نشان داد (۱۳ سویه، ۸۷ درصد) در مردان bdar) و از طرف دیگر، مورفوتایپ $P<$ ۰/۰۰۰۱). همچنین مورفوتایپ $P=$شیوع بالاتری داشت (۰/۰۶۵۷ در bdar در گروه سنی بالای ۶۰ سال و مورفوتایپ rdar گروه سنی ۳۵ تا ۵۹ سال فراوانی بالاتری داشتند. براساس نتایج حاصل از آزمون کمی میکروتیترپلیت، ۷۷ درصد سویه ها بیوفیلم منفی بودند و ۲۳ درصد توانایی تولید بیوفیلم داشتند. فراوانی جدایه های بیوفیلم مثبت در مطالعه فصلنامه

www.SID.ir

Archive of SID

Cucarella و همکاران (۳۱)، مهارلو و همکاران (۳۲) و فتاحی و همکاران (۳۳) به ترتیب ۷۱، ۹۲ و ۳۶ درصد گزارش گردید. تفاوت در فراوانی جدایه های بیوفیلم مثبت در مطالعات مختلف می تواند به علت تفاوت در سطح بهداشت، مقاومت آنتی بیوتیکی، منبع جداسازی نمونه ها، محدوده زمانی نمونه گیری و خصوصیات بالینی افراد بیمار باشد. در میان ۳۹ سویه بیوفیلم مثبت در آزمون میکروتیترپلیت، ۷ سویه (۱۸ درصد) بیوفیلم قوی، ۱۰ سویه (۲۶ درصد) بیوفیلم متوسط و ۲۲ سویه (۵۶ درصد) بیوفیلم ضعیف تولید کردند. در مطالعه تاجبخش و همکاران، از ۱۳۰ جدایه *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک، ۸۱ جدایه (۶۱/۵۳ درصد) قادر به تولید بیوفیلم بودند که ۱۵ (۱۸/۷۵ درصد)، ۲۰ (۲۵ درصد) و ۴۵ (۵۶/۲۵ درصد) جدایه به ترتیب بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف بودند (۳۴). زمانی و همکاران نیز ۸۴ درصد جدایه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک را تولیدکننده بیوفیلم متوسط تا قوی گزارش کردند (۳۵). Gawad و همکاران نشان دادند که ۴۴، ۱۰/۸ و ۲۱/۷ درصد جدایه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک به ترتیب بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف بودند (۳۶).

مقایسه توانایی تولید بیوفیلم با جنس و گروههای سنی افراد بیمار، شیوع بالاتر سویه های بیوفیلم قوی را در زنان و در محدوده سنی بالاتر از ۶۰ سال نشان داد و از طرف دیگر ارتباط قابل توجهی بین عفونتهای مردان و محدوده سنی ۱۰ تا ۳۴ سال با تشکیل بیوفیلم ضعیف دیده شد. نتایج آزمون میکروتیترپلیت که به منظور سنجش کمیت بیوفیلم تولید شده انجام گرفت به طور کامل نتایج حاصل از روش قرمز کنگو را تأیید کرد. تمام ۳۹ سویه تولید کننده سلولز و کورلای در روش قرمز کنگو که دارای مورفوتایپ‌های rdar، bdar و یا pdar بودند، در روش میکروتیتر پلیت نیز در گروه بیوفیلم مثبتها قرار گرفتند. در مطالعه Ponnusamy و همکاران در سال ۲۰۱۲، تشکیل بیوفیلم با روشهای ژلوز قرمز کنگو و میکروتیترپلیت در ۱۰۰ جدایه *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک مورد سنجش قرار گرفت و در روش ژلوز قرمز کنگو فراوانی گروههای بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف به ترتیب ۲۳، ۳۷ و ۴۰ درصد بود، اما در آزمون میکروتیترپلیت ۶ درصد جدایه ها واجد بیوفیلم قوی، ۸۰ درصد واجد بیوفیلم متوسط و ۱۴ درصد نیز واجد بیوفیلم ضعیف گزارش شدند (۳۷). علاوه بر این، یکی از نتایج قابل توجه، وجود ارتباط بین سویه های بیوفیلم قوی با توانایی تولید همزمان کورلای و سلولز بود، به طوریکه تمامی سویه های بیوفیلم قوی کلنیهایی واجد مورفوتایپ rdar تشکیل دادند. همچنین با وجود اینکه از ۱۵ سویه واجد مورفوتایپ rdar، ۷ سویه (۴۷ درصد) توانایی تولید بیوفیلم قوی داشتند، ولی از ۲۳ سویه با مورفوتایپ bdar همگی در گروه بیوفیلم متوسط و ضعیف قرار گرفتند و تنها سویه واجد مورفوتایپ pdar نیز بیوفیلم ضعیف بود که این نتایج اهمیت حضور همزمان هر دو ساختار کورلای و سلولز را برای تولید بیوفیلم قوی نشان می‌دهد. اهمیت حضور کورلای و سلولز برای تشکیل بیوفیلم، طی مطالعه Saldana و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز گزارش شده است، به طوریکه در مطالعه آنها نیز، اغلب سویه های واجد کورلای و سلولز توانایی تولید بیوفیلم قوی داشتند (۳۸). البته با توجه به اینکه ۵۳ درصد (۸/۱۵) سویه های واجد مورفوتایپ rdar، بیوفیلم متوسط و ضعیف تولید کردند، می توان به این نتیجه رسید که تولید بیوفیلم قوی در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک، علاوه بر دو ساختار کورلای و سلولز نیازمند اجزاء و ساختاری دیگری نیز می باشد که در مجموع باعث تشکیل بیوفیلمی با کمیت و کیفیت مناسب خواهند شد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه فراوانی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک تولید کننده بیوفیلم، کورلای و سلولز در میان افراد بیمار مبتلا به عفونت ادراری در بیمارستان الزهراء (س) اصفهان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق فراوانی سویه های مولد بیوفیلم و همچنین ارتباط بین توانایی تولید بیوفیلم با جنس، محدوده سنی افراد بیمار و انواع مورفوتایپهای سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک را آشکار کرد. به طور کلی مطالعه حاضر نشان داد اگرچه سویه های بیوفیلم مثبت در میان افراد بیمار فراوانی بالایی ندارند اما اغلب این سویه ها، توانایی تولید همزمان کورلای و سلولز و همچنین تولید بیوفیلم قوی را نشان دادند که نشانگر سازگاری آنها در جهت تشکیل مستحکمترین ساختار بیوفیلمی به منظور مقابله در برابر مجموعه سازوکارهای ایمنی ذاتی و اختصاصی موجود در دستگاه ادراری و همچنین مقاومت حداکثری نسبت به آنتی بیوتیکها می باشد. بسیاری از عفونتهای ادراری ایجاد شده توسط *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک به صورت عودشونده بروز می کنند که این عفونتها نتیجه تشکیل بیوفیلم و مقاوم شدن باکتری به شرایط نامساعد محیطی است. بنابراین بررسی و تشخیص بیوفیلم ایجاد شده توسط *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک و استفاده از درمان صحیح و اصولی عفونتهای

www.SID.ir

Archive of SID

ادراری می تواند کمک شایانی به حذف و ریشه‌کنی عامل مولد عفونت و جلوگیری از تشکیل عفونتهای عودشونده کند.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان و صندوق حمایت از پژوهشگران (طرح مصوب شماره ۹۷۰۱۴۸۴۵) به انجام رسیده است.

REFERENCES

1. Kim JM, Park ES, Teong TS, Kim KM, Kim TM, Ohir S. Multicentre surveillance study for nosocomial infections in major hospitals in Korea. Nosocomial Infection Surveillance Committee of the Korean Society for Nosocomial Infection Control. American Journal of Infection Control. 2000 Dec;28(5):454-58.
2. Emmerson AM EJ, Griffin M, Kelsey MC, Smyth ET. The second national prevalence survey of infections in hospitals-overview of the results. Journal of Hospital Infection. 1996 Mar;32(3):175-90.
3. Edmond MB, Wenzel RP. Nosocomial infection. 16th ed ed. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. New Yourk: Churchill livingstone; 2005.
4. Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. The American Journal of Medicine. 2002 Jul;113 14-9.
5. Sobel J, Kaye D. Urinary treat infections. 5th ed. Mandell G, Bennet J, Dolin R, editors. New Yourk: Churchil- Livingstone; 2000.
6. Post JC, Stoodley P, Hall–Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck surgery. 2004 Jun;12(3):185-90.
7. Mah T-FC, O'toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology. 2001 Jan;9(1):34-9.
8. Soto S, Smithson A, Martinez J, Horcajada J, Mensa J, Vila J. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. Journal of Urology. 2007 Jan;177(1):365-8.
9. Jolivet-Gougeon A, Bonnaure-Mallet M. Biofilms as a mechanism of bacterial resistance. Drug Discovery Today: Technologies. 2014 Mar;11:49-56.
10. Lo E, Nicolle LE, Coffin SE, Gould C, Maragakis LL, Meddings J, et al. Strategies to prevent catheter-associated urinary tract infections in acute care hospitals: 2014 update. Infection Control & Hospital Epidemiology. 2014 May;35(5):464–79
11. MacFaddin J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd Edition ed. Philadelphia: Baltimore (Md.): Williams and Wilkins; 2000.
12. Kai-Larsen Y, Lüthje P, Chromek M, Peters V, Wang X, Holm Å, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial peptide LL-37. PLoS Pathogen. 2010 Jul;6(7):e1001010.
13. Vareille M, de Sablet T, Hindré T, Martin C, AP G. Nitric Oxide Inhibits Shiga-toxin Synthesis by Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences 2007 Jun;104(24):0199-10204.

www.SID.ir

Archive of SID

14. Rahimi F, Mehmandoost J. Biofilm and Curli Formation among *Escherichia coli* Strains Isolated from Urinary Infections in Tehran. 2016, Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2018 May;23(81):9-15.
15. Stepanović S, Cirković I, Ranin L, M S-V. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Letters in Applied Microbiology. 2004 Apr;38(5):428-32.
16. Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection. Nature Reviews Urology. 2010 Dec;7(12):653-60.
17. Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HL, ME S. omplicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and Proteus mirabilis. Clinical Microbiology Reviews. 2008 Jan;21(1):26-59.
18. Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, et al. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. Journal of Applied Microbiology. 2016 Aug;121(2):309-19.
19. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, SJ H. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nature Reviews Microbiology. 2015 May;13(5):269-84.
20. Reid G, Denstedt JD, Kang YS, Lam D, C N. Microbial adhesion and biofilm formation on ureteral stents in vitro and in vivo. The Journal of Urology. 1992 Nov;148(5):1592-4.
21. Antão EM, Wieler LH, C E. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Gut Pathogens. 2009 Dec;1(1):1-22.
22. Hung C, Zhou Y, Pinkner JS, Dodson KW, Crowley JR, Heuser J, et al. *Escherichia coli* biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure. mBio. 2013 Sep;4(5):e00645-13.
23. Mihaylova M, Kostadinova S, M M. Distribution of virulence determinants and biofilmforming among clinical urinary isolates. Journal of BioScience and Biotechnology. 2012 Jun;SE/ONLINE:45-51.
24. Taj Y, Essa F, Aziz F, SU K. Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Journal of Infection in Developing Countries. 2012 May;6(5):403-9.
25. Akram M, Shahid M, AU K. tiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in J N M C Hospital Aligarh, India. Annals of Clinical Microbiology and antimicrobials. 2007 Mar;6(1):1-4.
26. Bosch FJ, van Vuuren C, G J. Antimicrobial resistance patterns in outpatient urinary tract infections-the constant need to revise prescribing habits. South African Medical Journal. 2011 May;101(5):328-31.
27. Lutter SA, Currie ML, Mitz LB, LA G. Antibiotic resistance patterns in children hospitalized for urinary tract infections. Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine. 2005 Oct;159(10):924–8.
28. Jadhav S, Hussain A, Devi S, Kumar A, Parveen S, Gandham N, et al. Virulence characteristics and genetic affinities of multiple drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* from a semi urban locality in India. PLoS One. 2011 Mar;6(3):e18063.
29. Brumbaugh AR, HL M. reventing urinary tract infection: progress toward an effective *Escherichia coli* vaccine. Expert Review of Vaccines. 2012 Jun;11(6):663-76.
30. Bokranz W, Wang X, Tschäpe H, U R. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. Journal of Medical Microbiology. 2005 Dec;54(12):1171-82.
31. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, JR P. Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation. Journal of Bacteriology. 2001 May;183(9):2888-96.
32. Marhova M, Kostadinova S, S. S. Biofilm-Forming Capabilities of Urinary *Escherichia coli* Isolates. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2010 May;24(sup1):589-93.

www.SID.ir

Archive of SID

33. Fattahi S, Kafil HS, Nahai MR, Asgharzadeh M, Nori R, M A. Relationship of biofilm formation and different virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Northwest Iran. GMS Hygiene and Infection Control. 2015 Jul;10:Doc11.
34. Tajbakhsh E, Ahmadi P, Abedpour-Dehkordi E, Arbab-Soleimani N, F K. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic *E. coli* isolated from clinical samples in Iran. Antimicrobial Resistance and Infection Control. 2016 Apr;5:11.
35. Zamani H, A S. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*: association with adhesion factor genes. Turkish Journal of Medical Sciences. 2018 Feb;48(1):162-7.
36. Gawad WE, Helmy OM, Tawakkol WM, AM H. Antimicrobial Resistance, Biofilm Formation, and Phylogenetic Grouping of Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates in Egypt: The Role of Efflux Pump-Mediated Resistance. Jundishapur Journal of Microbiology. 2018 Jan;11(2):e14444.
37. Ponnusamy P, Natarajan V, M S. In vitro biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* and their antimicrobial susceptibility pattern. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2012 Mar;5(3):210-3.
38. Saldaña Z, Xicohtencatl-Cortes J, Avelino F, Phillips AD, Kaper JB, Puente JL, et al. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. Environmental Microbiology. 2009 Apr;11(4):992-1006.

www.SID.ir