Archive of SID

تولید بیوفیلم و فراوانی ژنهای فیمبریه ای در میان سویه های *اشرشیا کلای* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در زاهدان در سال ۱۳۹۶

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

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

***نشانی برای مکاتبه:** اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، بخش میکروبیولوژی
f.rahimi@sci.ui.ac.ir

دریافت مقاله: تیر نود ونه پذیرش برای چاپ: بهمن نود و نه

چکیده

سابقه و هدف: تشکیل بیوفیلم شاخص اصلی در گسترش عفونتهای دستگاه ادراری ناشی از *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک محسوب می شود. تشکیل بیوفیلم نیازمند حضور مجموعه ای از ژنهای مختلف است که باعث تسهیل چسبندگی اولیه، بلوغ، تولید ماتریکس پلیمری خارج سلولی و پراکندگی بعدی باکتریها می شود. چندین عامل سطحی سلول از قبیل فلاژل، فیمبریه، کورلای و تولید اگزوپلی ساکارید در اتصال سلولهای باکتریایی به مجاری ادراری و گسترش بیوفیلم نقش دارند. در این مطالعه شیوع سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در شهر زاهدان و همچنین فراوانی ژنهای مؤثر در تشکیل بیوفیلم در میان این سویه ها مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: در طی سال ۱۳۹۶، در مجموع ۱۱۲ جدایه *اشرشیا کلای* از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در یک بیمارستان مرجع در شهر زاهدان جمع آوری گردید و با استفاده از آزمونهای بیوشیمیایی و PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مورد شناسایی قرار گرفتند. توانایی تشکیل کورلای و سلولز و همچنین تولید بیوفیلم در میان سویه ها به ترتیب با استفاده از آزمونهای کیفی ژلور قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، حضور ژنهای بیوفیلمی *csg*A، *pap*C، *fim*H، *sfa*S و *afa*I با استفاده از آزمون PCR تعیین گردید.

یافته‌ها: در مجموع ۸۵ سویه (۷۶ درصد) با استفاده از آزمون PCR به عنوان *اشرشیا کلای* مورد شناسایی و تأیید قرار گرفتند. در این میان، ۵۸ سویه (۶۸ درصد) مولد کورلای و سلولز بودند که به ترتیب ۷، ۸۸ و ۵ درصد سویه ها واجد مورفوتایپهای rdar، bdar و pdar بودند. علاوه بر این، ۵۲، ۳۱ و ۱۷ درصد سویه ها نیز به ترتیب مولد بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف بودند. ژنهای *csg*A، *pap*C، *fim*H، *sfa*S و *afa*I نیز به ترتیب در ۹۸، ۷۹، ۷۱، ۱۴ و ۱۰ درصد سویه ها مورد شناسایی قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان دهنده شیوع بالای سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم و واجد ژنهای مرتبط با تشکیل بیوفیلم در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری در زاهدان است. حضور این ژنها که مرتبط با چسبندگی باکتریها هستند، مؤید نقش مهم کورلای و فیمبریه در تشکیل بیوفیلم و در طی عفونت ادراری است که می توانند به عنوان اهداف مهمی در درمان حائز اهمیت باشند.

واژگان کلیدی: ***اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، بیوفیلم، کورلای، سلولز، ژنهای فیمبریه ای**

مقدمه

عفونت مجاری ادراری با وقوع تقریباً ۱۵۰ میلیون مورد در سال، یکی از شایعترین بیماریهای عفونی در سراسر جهان است که منجر به مرگ و میرهای قابل توجه در بیمارستان و جامعه شده است (۱). این عفونت با تهاجم میکروارگانیسمها (باکتریها، ویروسها و قارچها) به مجاری ادراری آغاز شده و با تکثیر و انتشار آنها در بخشهای مختلف، منجر به تغییرات عملکردی در دستگاه ادراری و کلیه ها می شود (۲). اگرچه جنسها و گونه های مختلف باکتریها توانایی ایجاد عفونت ادراری را دارند؛ ولی سویه های اوروپاتوژنیک اشرشیا کلای از مهمترین عوامل ایجاد این عفونت محسوب می شوند که تقریباً

www.SID.ir

Archive of SID

۷۰-۸۵ درصد عفونتهای ادراری در انسان به آنها نسبت داده می شود (۱). علاوه بر عفونت دستگاه ادراری، عفونتهایی مانند پریتونیت، سپتی سمی و باکتریمی نیز از عفونتهای خارج روده ای ایجاد شده توسط سویه های بیماریزای اشرشیا کلای می باشند (۳). با اینکه عفونت مجاری ادراری در هر دو جنس و تقریباً در تمامی سنین رخ می دهد، ولی برخی گروهها مانند نوزادان، زنان باردار و افراد مسن از آسیب پذیری بیشتری برخوردار می باشند (۴).

توانایی تشکیل بیوفیلم، در بیشتر میکروارگانیسمها دیده می شود که این ویژگی باعث افزایش مقاومت آنها نسبت به عوامل ضدمیکروبی مختلف و همچنین افزایش احتمال زنده ماندن و بقاء در جوامع و محیطهای گوناگون می شود (۵). علاوه بر آن، سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک نوع خاصی از بیوفیلم را که به صورت اجتماعات باکتریایی درون سلولی می باشد در داخل سلولهای پوششی مثانه تولید می کنند که باعث مقاومت باکتری در برابر قدرت پاک کننده جریان ادرار، عوامل ضدمیکروبی و سازوکارهای دفاعی میزبان شده و یکی از عوامل اصلی عود عفونتهای ادراری محسوب می شود (۶). اولین مرحله در تشکیل بیوفیلم، اتصال باکتریها به یکدیگر یا سطوح زنده و غیرزنده محیط می باشد که موفقیت در این اتصال وابسته به عوامل چسبندگی موجود در سطح باکتری است (۷). در سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک، عوامل چسبندگی مختلفی در تشکیل بیوفیلم و ایجاد عفونت ادراری نقش دارند که از مهمترین ساختارهای با نقش اتصالی، فیمبریه مجعد (کورلای)، فیمبریه نوع ۱، فیمبریه P، فیمبریه S و فیمبریه DR را می توان نام برد (۸, ۹).

فیمبریه مجعد که به صورت الیاف پروتئینی نازک و بسیار پیچ خورده است، باعث اتصال باکتری اشرشیا کلای به پروتئینهای متنوع میزبان و کلونیزاسیون باکتری در بافتهای مختلف می شود. این فیمبریه توسط دو خوشه ژنی csgBA و csgDEFG رمزگذاری می شود که ژن csgA زیرواحد اصلی فیمبریه را می سازد و ژن csgD، در سنتز کورلای و همچنین سنتز سلولز به عنوان تنظیم کننده عمل می کند (۷). سلولز یکی از مهمترین ترکیبات موجود در ماتریکس بیوفیلمی سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک بوده و نقش مهمی در اتصال این سویه ها به سطوح زنده و غیر زنده دارد. سنتز همزمان این دو ساختار در سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک بسیار معمول است و باعث ایجاد یک بستر آب گریز و خشن می شود (۱۰). فیمبریه نوع ۱، در بیش از ۹۰ درصد سویه های اشرشیا کلای حضور دارد و توسط خوشه ژنی fim که شامل ۹ ژن است رمزگذاری می شود. fimH، نوک چسبنده فیمبریه نوع ۱ را تشکیل می دهد و در اتصال باکتری به گیرنده های سلولهای پوششی دستگاه ادراری و همچنین جذب باکتری به داخل سلولهای اپیتلیال مثانه دخالت دارد (۱۱). فیمبریه P، دومین فیمبریه شایع در سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک است و نقش مهمی در ایجاد عفونتهای قسمت فوقانی دستگاه ادراری به ویژه پیلونفریت دارد. این فیمبریه توسط ژنهای خوشه ژنی pap رمزگذاری می شود که در میان این ژنها، papG نوک چسبنده فیمبریه P را تشکیل می دهد (۱۲). فیمبریه S، توسط خوشه ژنی sfa رمزگذاری می شود و زیرواحد اصلی آن sfaS است که با اتصال به گیرنده های سلولی حاوی اسید سیالیک موجود بر روی سلولهای پوششی کلیه و همچنین اندوتلیال رگهای کلیه، نقش مهمی در عفونت ادراری ایفا می کند (۱۳). خانواده فیمبریه DR نیز ارتباط مهمی با ایجاد عفونتهای ادراری عود شونده ناشی از اشرشیا کلای دارند. ادهسین غیرفیمبریه ای نوع ۱ (AFAI) از اعضای خانواده فیمبریه DR می باشد که توسط ژن afaI رمزگذاری شده و از نظر خصوصیات مورفولوژی و بیوشیمیایی با عوامل اتصالی فیمبریه ای تفاوت دارد (۱۲, ۱۴).

این مطالعه با هدف تعیین تولید بیوفیلم و فراوانی ژنهای فیمبریه ای در سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنتیک تولید-کننده بیوفیلم جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در یک بیمارستان مرجع در شهر زاهدان در طی سال ۱۳۹۶ به انجام رسیده است.

روش کار

طی شهریور لغایت بهمن ۱۳۹۶ در مجموع تعداد ۱۱۲ جدایه اشرشیا کلای جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری در یک بیمارستان مرجع در زاهدان، جمع آوری گردید. با رعایت شرایط استاندارد و حفظ زنجیره سرد، انتقال پلیتهای جمع آوری شده به صورت هفتگی از آزمایشگاه بیمارستان به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه اصفهان صورت گرفت. جهت شناسایی اولیه، ابتدا هر جدایه بر روی محیط ژلوز مک کانکی (Merck, Germany) به صورت خطی کشت داده شد و جدایه های با رنگ کلنی صورتی به عنوان سویه های مشکوک به اشرشیا کلای بر روی محیط ژلوز ائوزین متیلن بلو (Merck, Germany) کشت داده شد و

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه های با رنگ کلنی ارغوانی تیره و یا جلای سبز فلزی برای انجام آزمون PCR انتخاب شدند و جهت انجام مطالعات بعدی در ویالهای کرایو حاوی ۵۰ درصد گلیسرول و ۵۰ درصد محیط آبگوشت Brain Heart Infusion (BHI) (Scharlau, Spain) در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۱۵). به منظور شناسایی و تأیید جدایه ها از آزمون PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن tufA استفاده شد.

به منظور استخراج DNA جهت انجام آزمون PCR از روش جوشاندن براساس دستورالعمل Kai-Larsen استفاده شد (۱۶). بر این اساس، یک کلنی از هر جدایه باکتریایی در میکروتیوب استریل حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد و به خوبی ورتکس گردید و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. سپس سانتریفیوژ در دور g ×۱۲۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت و در نهایت ۲ میکرولیتر از مایع رویی به عنوان DNA الگو جهت انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت.

شناسایی و تأیید نهایی جدایه های اشرشیا کلای به وسیله آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن tufA و بر اساس دستورالعمل و چرخه حرارتی معرفی‌شده توسط Vareille و همکاران صورت گرفت (۱۷). از سویه اشرشیا کلای ATCC 25922 نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

بررسی کیفی تشکیل بیوفیلم (تولید کورلای و سلولز) در میان سویه های تأیید شده اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک، با آزمون ژلوز قرمز کنگو بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران انجام شد (۱۸). بر این اساس، پس از کشت هر سویه بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو و گرمخانه گذاری به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، تقسیم بندی سویه ها بر اساس توانایی تولید کورلای و سلولز به ۴ مورفوتایپ rdar (کورلای+ و سلولز+)، bdar (کورلای+ و سلولز-)، pdar (کورلای- و سلولز+) و saw (کورلای- و سلولز-) صورت گرفت. سویه های واجد مورفوتایپهای rdar، bdar و pdar به عنوان سویه های تولیدکننده بیوفیلم تعیین شدند. در این مطالعه از سویه اشرشیا کلای Nissle1917 (کورلای+ و سلولز+) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

تعیین توانایی کمّی تولید بیوفیلم در میان سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک که به روش کیفی قرمز کنگو بیوفیلم مثبت بودند به روش میکروتیترپلیت و بر اساس دستورالعمل Stepanovic و همکاران با اندکی تغییرات انجام گرفت (۱۹). پس از ثبت نتایج جذب نوری پلیتها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانشگر الایزا (Stat Fax 2100)، میانگین جذب نوری سه حفره مربوط به هر سویه (ODs) محاسبه گردید و با میانگین جذب نوری سه حفره کنترل (ODnc) مقایسه شدند. بر این اساس، اگر 4ODnc<ODs بود به عنوان سویه های مولد بیوفیلم قوی و اگر ODs<ODnc بود به عنوان سویه های بیوفیلم منفی طبقه‌بندی شدند. تولید بیوفیلم متوسط و ضعیف نیز به ترتیب به صورت 2ODnc<ODs<4ODnc و ODnc<ODs<2ODnc بود.

شناسایی و میزان شیوع مجموعه ای از مهمترین ژنهای مؤثر در تشکیل بیوفیلم شامل؛ csgA (سنتز زیرواحد اصلی فیمبریه مجعد)، papC (سنتز فیمبریه P)، fimH (سنتز بخش اتصالی فیمبریه نوع ۱)، sfaS (سنتز زیرواحد اصلی فیمبریه S) و afaI (سنتز ادهسین غیرفیمبریه ای نوع ۱) در سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت با آزمون PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر ژن انجام شد. تکثیر ژنهای papC، sfaS و afaI با واکنش مالتی پلکس PCR براساس دستورالعمل Yamamoto 1995 (۲۰) و تکثیر ژنهای csgA و fimH از طریق واکنشهای PCR جداگانه براساس دستورالعمل به ترتیب Silva 2013 (۲۱) و Bauer 2002 (۲۲) انجام شد.

یافته ها

از مجموع ۱۱۲ جدایه اشرشیا کلای جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در یک بیمارستان مرجع در زاهدان در طی شش ماه در سال ۱۳۹۶، با استفاده از آزمونهای فنوتایپی (کشت بر روی محیطهای مک کانکی و ائوزین متیلن بلو) و ژنوتایپی (PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن tufA) در مجموع ۸۵ سویه (۷۶ درصد) به عنوان اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک شناسایی و تأیید شدند. سایر سویه ها (۲۷ سویه، ۲۴ درصد) که فاقد باند اختصاصی برای ژن tufA بودند از مطالعه خارج شدند. نتایج حاصل از آزمونهای فنوتایپی و ژنوتایپی نیز کاملا منطبق بر یکدیگر بودند.

بازه سنی افراد بیمار ۱ تا ۹۰ سال با میانگین سنی ۴۱ سال بود که در این میان ۷۱ درصد سویه ها (۶۰ سویه) از خانمها و ۲۹ درصد سویه ها (۲۵ سویه) نیز از آقایان جداسازی شدند

www.SID.ir

Archive of SID

(جدول ۱). در مجموع از ۸۵ سویه اشرشیا کلای، ۶۷ سویه (۷۹ درصد) متعلق به بیماران بستری و ۱۸ سویه (۲۱ درصد) نیز متعلق به بیماران سرپایی بود.

جدول ۱- توزیع فراوانی بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری براساس سن و جنس. زاهدان. ۱۳۹۶

سن	جنس: مرد		زن		تعداد
	بستری (درصد)	سرپایی (درصد)	بستری (درصد)	سرپایی (درصد)	(درصد)
۰-۱۵	۵ (۲۵)	۱ (۵)	۱۱ (۵۵)	۳ (۱۵)	۲۰ (۲۴)
۱۶-۳۰	۱ (۷)	۲ (۱۴)	۹ (۶۵)	۲ (۱۴)	۱۴ (۱۶)
۳۱-۵۰	۳ (۱۸)	۲ (۱۲)	۸ (۴۷)	۴ (۲۳)	۱۷ (۲۰)
۵۱-۹۰	۱۰ (۲۹)	۱ (۳)	۲۰ (۵۹)	۳ (۹)	۳۴ (۴۰)
تعداد کل	۱۹ (۲۲)	۶ (۷)	۴۸ (۵۷)	۱۲ (۱۴)	۸۵

از مجموع ۸۵ سویه اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک شناسایی شده، ۵۸ سویه (۶۸ درصد) قادر به تشکیل بیوفیلم با واسطه تولید کورلای و سلولز بودند و ۲۷ سویه (۳۲ درصد) با تشکیل کلنیهایی با مورفوتایپ saw، قادر به تولید کورلای و سلولز نبودند و به عنوان سویه های بیوفیلم منفی در نظر گرفته شدند علاوه بر این، در میان ۵۸ سویه مولد بیوفیلم (کورلای و سلولز)، ۴ سویه (۷ درصد) با تولید همزمان کورلای و سلولز واجد مورفوتایپ rdar، ۵۱ سویه (۸۸ درصد) با تولید فقط کورلای واجد مورفوتایپ bdar و ۳ سویه (۵ درصد) نیز با تولید فقط سلولز واجد مورفوتایپ pdar بودند.

براساس نتایج سنجش کمّی تولید بیوفیلم با روش میکروتیترپلیت در میان سویه های اشرشیا کلای ادراری، ۵۸ سویه (۶۸ درصد) بیوفیلم مثبت بودند و ۲۷ سویه (۳۲ درصد) در گروه بیوفیلم منفی قرار گرفتند. ارتباط مستقیمی بین نتایج بررسی توانایی کمّی تولید بیوفیلم با نتایج تولید کورلای و سلولز در روش قرمز کنگو مشاهده شد، به طوریکه تمام سویه های با مورفوتایپ rdar، bdar و pdar بیوفیلم مثبت بودند و تمامی سویه های با مورفوتایپ saw نیز در گروه بیوفیلم منفی قرار گرفتند. در میان سویه های بیوفیلم مثبت، ۳۰ سویه (۵۲ درصد) مولد بیوفیلم قوی، ۱۸ سویه (۳۱ درصد) مولد بیوفیلم متوسط و ۱۰ سویه (۱۷ درصد) مولد بیوفیلم ضعیف بودند.

ارتباط قابل توجهی بین توانایی تولید کورلای و سلولز با تولید بیوفیلم وجود دارد. بر این اساس مشخص شد که ۱۰۰ درصد سویه های واجد مورفوتایپ rdar مولد بیوفیلم قوی بودند. همچنین، با وجود اینکه ۵۱ درصد سویه های bdar در گروه بیوفیلم قوی قرار گرفتند ولی هیچکدام از سویه های واجد مورفوتایپ pdar توانایی تولید بیوفیلم قوی نداشتند و ۶۷ درصد این سویه ها مولد بیوفیلم ضعیف بودند.(جدول ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- توزیع فراوانی مورفوتایپهای rdar، bdar و pdar براساس گروههای بیوفیلمی مختلف در اشرشیای کولای جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری. زاهدان. ۱۳۹۶

فراوانی مورفوتایپ	بیوفیلم		
	بیوفیلم قوی (درصد)	بیوفیلم متوسط (درصد)	بیوفیلم ضعیف (درصد)
rdar	۴ (۱۰۰)	۰	۰
bdar	۲۶ (۵۱)	۱۷ (۳۳)	۸ (۱۶)
pdar	۰	۱ (۳۳)	۲ (۶۷)
تعداد کلی	۳۰ (۵۲) درصد)	۱۸ (۳۱) درصد)	۱۰ (۱۷) درصد)

۹۸ درصد سویه ها (۵۷ سویه) واجد ژن *csg*A (رمزکننده زیرواحد اصلی فیمبریه مجعد) و ۴۶ سویه (۷۹ درصد) نیز از نظر وجود ژن *pap*C (رمزکننده زیرواحد ساختمانی فیمبریه P) مثبت بودند. همچنین، ۷۱ درصد سویه ها (۴۱ سویه) نیز واجد ژن *fim*H (رمزکننده زیرواحد ساختمانی فیمبریه نوع ۱) بودند. فراوانی ژنهای *sfa*S (رمزکننده زیرواحد اصلی فیمبریه S) و *afa*I (رمزکننده ادهسین غیرفیمبریه ای نوع I) نیز به ترتیب محدود به ۱۴ درصد (۸ سویه) و ۱۰ درصد (۶ سویه) بود. همچنین، ۹۳ درصد سویه های واجد هر یک از ژنهای فیمبریه ای، حداقل از نظر وجود یک ژن فیمبریه دیگر نیز مثبت بودند. از طرف دیگر، درمیان ۵۸ سویه بیوفیلم مثبت، ۴ سویه با اینکه فاقد ژنهای فیمبریه ای *fim*H، *pap*C، *sfa*S و *afa*I بودند ولی قابلیت ایجاد بیماری و تشکیل بیوفیلم داشتند که البته در میان آنها ۳ سویه (۷۵ درصد) بیوفیلم ضعیف بودند و ۲ سویه (۵۰ درصد) توانایی تولید کورلای را نداشتند (pdar).از مجموع ۵ ژن بیوفیلمی بررسی شده، فقط ژنهای *csg*A و *afa*I در سویه های pdar حضور داشتند. به جز ژن *afa*I که در سویه های با مورفوتایپ rdar شناسایی نشد؛ سایر ژنهای بیوفیلمی در دو مورفوتایپ rdar و bdar، از فراوانی نسبتاً یکسانی برخوردار بودند. ژن *csg*A در ۱۰۰ درصد سویه های واجد مورفوتایپ rdar و bdar شناسایی شد که مؤید نقش و اهمیت حضور این ژن در سویه های مولد کورلای می باشد. از طرف دیگر، فراوانی ژنهای *pap*C و *fim*H در سویه های واجد مورفوتایپ rdar و bdar، به طور قابل توجهی بالاتر از ژنهای *sfa*S و *afa*I بود (جدول ۳).

جدول ۳- توزیع فراوانی مورفوتایپها براساس ژنهای مؤثر در تشکیل بیوفیلم در اشرشیای کولای جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری. زاهدان. ۱۳۹۶

فراوانی مورفوتایپ	ژنهای مؤثر در تشکیل بیوفیلم				
	*csg*A (درصد)	*pap*C (درصد)	*sfa*S (درصد)	*fim*H (درصد)	*afa*I (درصد)
rdar	۴ (۱۰۰)	۲ (۵۰)	۱ (۲۵)	۳ (۷۵)	۰
bdar	۵۱ (۱۰۰)	۴۴ (۸۶)	۷ (۱۴)	۳۸ (۷۴)	۵ (۱۰)
pdar	۲ (۶۷)	۰	۰	۰	۱ (۳۳)
تعداد کلی	۵۷ (۹۸) درصد)	۴۶ (۷۹) درصد)	۸ (۱۴) درصد)	۴۱ (۷۱) درصد)	۶ (۱۰) درصد)

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه شیوع ژنهای فیمبریه ای در گروههای بیوفیلمی مختلف، نشان دهنده فراوانی بالاتر ژنهای *pap*C، *sfa*S و *fim*H در سویه های بیوفیلم قوی و متوسط نسبت به سویه های بیوفیلم ضعیف بود. از طرف دیگر، ۱۰۰ درصد سویه های بیوفیلم قوی و متوسط و ۹۰ درصد سویه های بیوفیلم ضعیف، واجد ژن *csg*A بودند. علاوه بر این، ژن *afa*I در سویه های بیوفیلم قوی (۱۰ درصد)، بیوفیلم متوسط (۱۱ درصد) و بیوفیلم ضعیف (۱۰ درصد) از فراوانی تقریبا مشابهی برخوردار بود (جدول ۴).

جدول ۴- توزیع فراوانی سویه های مولد بیوفیلم براساس ژنهای مؤثر در تشکیل بیوفیلم در اشرشیای کولای جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری. زاهدان. ۱۳۹۶

فراوانی بیوفیلم	ژنهای مؤثر در تشکیل بیوفیلم				
	*csg*A	*pap*C	*sfa*S	*fim*H	*afa*I
بیوفیلم قوی	۳۰ (۱۰۰)	۲۵ (۸۳)	۲ (۷)	۲۴ (۸۰)	۳ (۱۰)
بیوفیلم متوسط	۱۷ (۱۰۰)	۱۵ (۸۳)	۶ (۳۳)	۱۶ (۸۹)	۲ (۱۱)
بیوفیلم ضعیف	۹ (۹۰)	۶ (۶۰)	۰	۱ (۱۰)	۱ (۱۰)
تعداد کلی	۵۷ (۹۸ درصد)	۴۶ (۷۹ درصد)	۸ (۱۴ درصد)	۴۱ (۷۱ درصد)	۶ (۱۰ درصد)

بحث

سویه های خارج روده ای *اشرشیا کلای* باعث ایجاد عفونت در نقاط مختلف بدن انسان از سیستم صفراوی تا سیستم اعصاب مرکزی می شوند که منجر به مرگ ۴۰ هزار نفر و حداقل ۲/۶ میلیارد دلار هزینه در ایالات متحده شده است. *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک یک *باکتری* بیماریزای خارج روده ای است که عامل اصلی عفونتهای دستگاه ادراری اکتسابی از جامعه (۷۰ تا ۹۵ درصد) و نیز بخش عمده ای از عفونتهای ادراری بیمارستانی (۵۰ درصد) محسوب می شود (۱). عفونت دستگاه ادراری به ویژه در زنان یک مشکل جدی است؛ چرا که نزدیک به ۵۰ درصد کل زنان در جوامع مختلف حداقل یک بار در طول زندگی این عفونت را تجربه می کنند و از این تعداد ۲۵ درصد دچار عفونت مکرر می شوند (۲۳).

در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، تشکیل بیوفیلم یک مرحله بسیار مهم در فرآیند ایجاد عفونت در میزبان به شمار می رود، به طوریکه توانایی اتصال به سطوح و تشکیل بیوفیلم از مهمترین ویژگیهای مرتبط با بیماریزایی این باکتری می باشد (۲۴). چندین عامل بیماریزایی در اتصال، کلونیزاسیون و تهاجم این باکتری به سلولهای میزبان دخالت دارند. عوامل بیماریزایی موجود در سطح سلول در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، شامل انواع مختلفی از عوامل اتصالی است که علاوه بر شرکت در تشکیل بیوفیلم، باعث افزایش سازگاری باکتری به محیطهای جدید و ایجاد طیف گسترده ای از بیماریها می شوند (۱۲). ساختار اختصاصی موجود در بیوفیلم، به ویژه حضور ماتریکسی فشرده در اطراف باکتریها، باعث حفاظت از باکتری در برابر نیروی پاک کننده جریان ادرار، عوامل ضدمیکروبی و سازوکارهای دفاعی میزبان شده که منجر به ایجاد عفونتهای مزمن و پایدار و مشکلات درمانی عفونتهای ناشی از تشکیل بیوفیلم می شود (۲۵). براساس تحقیقات علمی منتشر شده، میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکها و عوامل ضدمیکروبی در باکتریهای مولد بیوفیلم، ۵۰۰ تا ۵۰۰۰ برابر بیشتر از حالت پلانکتونی آنها می باشد (۲۶). از طرف دیگر، سویه های *اشرشیا کلای* موجود در بیوفیلم با داشتن عوامل مقاومت مختلف، می توانند به عنوان یک مخزن مهم واجد عناصر ژنتیکی مقاومت، باعث انتقال و گسترش مقاومت به سویه های کامنسال *اشرشیا کلای* و همچنین سایر باکتریهای بیماریزا شوند (۲۷). مطالعات

www.SID.ir

Archive of SID

مختلف انجام شده نیز افزایش سطح مقاومت سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم را نسبت به آنتی بیوتیکهای اصلی نشان داده است (۲۷, ۲۸).

اولین مرحله در تشکیل بیوفیلم و ایجاد عفونت ادراری، توانایی اتصال باکتری به سطوح زنده و غیرزنده محیط اطراف می باشد. در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، زوائد سطحی و خارج سلولی متنوعی مانند تاژک، فیمبریه نوع ۱، فیمبریه کورلای و ... در اتصال باکتری نقش دارند که با تکنیکهای فنوتایپی و ژنوتایپی مختلفی می توان این عوامل را تشخیص داد (۲۹, ۳۰). برهمکنش بین سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک با سطوح زیستی و غیرزیستی، پدیده ای چندوجهی است که با توجه به لزوم برقراری اتصال مناسب در این پدیده، هماهنگی بالایی در تنظیم بیان مجموعه عوامل اتصالی وجود دارد. بررسی ژنهای مربوط به عوامل اتصالی نیز نشان داده است که این ژنها به صورت منفرد و جداگانه بیان نمی شوند؛ بلکه به منظور افزایش بیماریزایی و پایداری باکتری در برابر شرایط سخت موجود در دستگاه ادراری، غالباً به صورت دسته جمعی و هماهنگ بیان می شوند (۳۱). در واقع شدت عفونت ادراری می تواند منعکس کننده پروفایل ژنهای اتصالی یا فنوتایپ سویه عفونی باشد و از طرف دیگر حضور این عوامل اتصالی ارتباط مستقیمی با کمیت و کیفیت بیوفیلم تشکیل شده نیز دارد. البته تنظیم سنتز بیوفیلم بسیار پیچیده است و اطلاعات کمی از تشکیل بیوفیلم در گونه های مختلف در دسترس می باشد. توانایی تولید بیوفیلم و ارتباط عوامل اتصالی مختلف با تشکیل بیوفیلم در باکتریهای *استافیلوکوکوس اورئوس* (۳۲) و *اشرشیا کلای* (۳۵-۳۳) بررسی شده است.

ساختارهای چسبنده ای که معمولاً توسط سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک ساخته می شوند، شامل فیمبریه کورلای، فیمبریه P، فیمبریه S، فیمبریه نوع ۱ و ادهسین غیرفیمبریه ای نوع ۱ می باشد که به ترتیب توسط خوشه های ژنی *csg*، *pap*، *sfa*، *fim* و *afa* رمزگذاری می شوند (۳۶). یکی از صفات ویژه ای که باکتریهای موجود در بیوفیلم را از حالت پلانکتونی متمایز می کند، حضور ماتریکس خارج سلولی در اطراف باکتریهای مولد بیوفیلم است که در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، فیمبریه کورلای ساختار اصلی این ماتریکس را تشکیل می دهد. ترکیب مهم دیگر موجود در این ماتریکس سلولز می باشد که در کنار سایر ساختارهای ماتریکسی باعث استحکام و حفظ ساختار سه بعدی بیوفیلم می شود. ژن *csg*A یکی از اعضای خوشه ژنی *csg* می باشد که مسئول سنتز زیرواحد اصلی فیمبریه کورلای است (۱۰). ژن *pap*C در سنتز فیمبریه P دخالت دارد و این فیمبریه که در اغلب سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک یافت می شود، نقش مهمی در عفونتهای ادراری بالارونده مثل پیلونفریت دارد (۱۲). فیمبریه نوع ۱ نیز توسط بسیاری از سویه های *اشرشیا کلای* تولید می شود و در تهاجم و اتصال باکتری به سلولهای میزبان نقش دارد. علاوه بر آن، این فیمبریه نقش حیاتی در توانایی *اشرشیا کلای* برای تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح زنده و غیرزنده بازی می کند؛ به طوریکه در جهش یافته های *fim*H، توانایی اتصال باکتری به میزان زیادی کاهش می یابد (۱۱). ژن *sfa*S زیرواحد اصلی فیمبریه S را سنتز می کند و ژن *afa*I ادهسین غیرفیمبریه ای نوع ۱ را رمزگذاری می کند. این دو فیمبریه نیز نقش مهمی در توانایی اتصال سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک در روند ایجاد بیماری و تشکیل بیوفیلم دارند (۱۳, ۱۴).

در این مطالعه، شیوع عفونت ادراری در جمعیت زنان، گروه سنی بالاتر از ۵۰ سال و افراد بستری؛ بالاتر از سایر گروهها بود که می تواند به علت مجموعه عوامل خطر موجود در این گروهها باشد. شیوع بالاتر عفونت ادراری در زنان طی مطالعات امین و همکاران (۳۷) و Bazar و همکاران (۳۸) نیز گزارش شده است. در این مطالعه، فراوانی سویه های تولیدکننده کورلای و سلولز ۶۸ درصد (۵۸ سویه) بود که در میان آنها، ۴ سویه (۷ درصد) توانایی تولید همزمان کورلای و سلولز، ۵۱ سویه (۸۸ درصد) تنها توانایی تولید کورلای و ۳ سویه (۵ درصد) نیز تنها توانایی تولید سلولز را داشتند. به طور کلی در این سویه ها که به عنوان بیوفیلم مثبت در نظر گرفته شدند، توانایی تولید کورلای از سلولز بیشتر بود که مشابه با نتایج تحقیق Bokranz و همکاران بود (۳۹). در میان ۵۸ سویه بیوفیلم مثبت در آزمون میکروتیترپلیت، ۳۰ سویه (۵۲ درصد) مولد بیوفیلم قوی، ۱۸ سویه (۳۱ درصد) مولد بیوفیلم متوسط و ۱۰ سویه (۱۷ درصد) مولد بیوفیلم ضعیف بودند. اغلب سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک در این مطالعه، بیوفیلم مثبت بودند (۶۸ درصد) و از طرف دیگر در میان سویه های بیوفیلم مثبت، بیشتر سویه ها توانایی تولید بیوفیلم متوسط تا قوی داشتند (۸۳ درصد) که بر این اساس، می توان به تأثیر توانایی تولید بیوفیلم در بیماریزایی این باکتری پی برد. ارتباط بین تشکیل بیوفیلم و بیماریزایی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک در مطالعات Soto و همکاران

www.SID.ir

Archive of SID

(۴۰) و Naves و همکاران (۴۱) نیز گزارش شده است. همچنین، بین نتایج ارزیابی کیفی و کمّی تولید بیوفیلم ارتباط و هماهنگی کاملی دیده شد، به طوریکه تمام ۵۸ سویه تولید کننده کورلای و سلولز در روش قرمز کنگو که دارای مورفوتایپهای rdar، bdar و یا pdar بودند، در روش میکروتیترپلیت نیز در گروه بیوفیلم مثبتها قرار گرفتند. علاوه بر این، ارتباط قابل توجهی بین توانایی تولید کورلای و سلولز با تولید بیوفیلم قوی دیده شد؛ به طوریکه ۱۰۰ درصد سویه های واجد مورفوتایپ rdar، بیوفیلم قوی بودند. از طرف دیگر، هیچکدام از سویه های pdar توانایی تولید بیوفیلم قوی نداشتند و بیشتر این سویه ها (۶۷ درصد) در گروه بیوفیلم ضعیف قرار گرفتند که این نتیجه مؤید نقش مهمتر کورلای نسبت به سلولز در تشکیل بیوفیلم قوی می باشد. 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 (۴۲).

طی مطالعات مختلف، نقش و اهمیت عوامل اتصالی سطحی در روند تشکیل بیوفیلم و ایجاد عفونت ادراری توسط سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک تأیید شده است. در مطالعه حاضر، با استفاده از آزمون PCR، حضور ژنهای مرتبط با تولید بیوفیلم در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مورد بررسی قرار گرفت و به این وسیله، ارتباط نتایج فنوتایپی تولید بیوفیلم با شیوع ژنهای مرتبط با بیوفیلم مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. فراوانی ژنهای *csg*A، *pap*C، *fim*H، *sfa*S و *afa*I در میان ۵۸ سویه *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت به ترتیب ۹۸، ۷۹، ۷۱، ۱۴ و ۱۰ درصد بود. در این مطالعه، ژن *csg*A شیوع بسیار بالایی (۹۸ درصد) در میان سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت نشان داد که با توجه به فراوانی بالای سویه های تولیدکننده کورلای (۹۵ درصد) در آزمون ژلوز قرمز کنگو و نقش این ژن در سنتز زیرواحد اصلی فیمبریه کورلای، می توان این فراوانی بالا را توجیه کرد. بر اساس مطالعات تکاملی، فیمبریه کورلای و خوشه ژنی *csg*، از بخشهای حفاظت شده *اشرشیا کلای* می باشند که تقریباً در همه اعضای این گونه وجود دارند (۴۳). در غربالگری ۳۱۷ جدایه *اشرشیا کلای* از نظر ژنهای بیوفیلمی توسط Frommel و همکاران نیز شیوع بالای ژن *csg*A (۹۵ درصد) گزارش شد (۴۴). ژنهای *pap*C و *fim*H نیز از فراوانی بالایی در میان سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک در این مطالعه برخوردار بودند و در مقابل ژنهای *sfa*S و *afa*I کمترین فراوانی را در میان ژنهای مورد بررسی داشتند. فراوانی بالای ژنهای *pap*C و *fim*H و همچنین فراوانی کمتر ژنهای *sfa*S و *afa*I نیز در سایر مطالعات گزارش شده است (۴۵-۴۹) که درمجموع می توان به اهمیت بیشتر فیمبریه P و فیمبریه نوع ۱ در تشکیل بیوفیلم پی برد. ناظمی و همکاران میزان شیوع ژنهای فیمبریه ای *fim*H، *pap*C، *sfa*S و *afa*I را در سویه های *اشرشیا کلای* ادراری به ترتیب ۹۴، ۳۵، ۳۱ و ۱۰ درصد تعیین کردند (۵۰). در مطالعه عربی و همکاران بر روی ۳۴۳ سویه *اشرشیا کلای*، شیوع ژنهای *sfa*S، *pap*C و *afa*I به ترتیب ۸۷/۷، ۲۳/۹ و ۱۶/۶ درصد گزارش گردید (۵۱). همچنین فراوانی ژنهای *fim*A ، *sfa*S و *pap*C در مطالعه ممتاز و همکاران به ترتیب ۸۶/۱۷، ۵۳/۶۵ و ۵۰/۴۰ درصد تعیین شد (۵۲). در مطالعه Tiba و همکاران (۵۳)، میزان شیوع ژنهای *pap*C، *sfa*S و *afa*I به ترتیب ۳۲/۷، ۲۷/۸ و ۶/۲ درصد گزارش گردید. در مطالعه Rijavec و همکاران (۵۴)، از ۱۰۵ سویه *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، ۵۳ درصد سویه ها بیوفیلم مثبت بودند و میزان شیوع ژنهای *fim*H، *pap*C، *sfa*S و *afa*I در این سویه های بیوفیلم مثبت به ترتیب ۹۵، ۵۵، ۲۴ و ۳ درصد بود. همچنین نتایج این مطالعه نشان دهنده ارتباط مستقیمی بین حضور همزمان فیمبریه P، فیمبریه S، فیمبریه نوع ۱ و ادهسین غیرفیمبریه ای نوع ۱ بود؛ به طوریکه ۹۳ درصد سویه های واجد هر یک از این ژنهای فیمبریه ای، حداقل از نظر وجود یک ژن فیمبریه دیگر نیز مثبت بودند. در مطالعه Johnson و همکاران نیز ارتباط بین ژن *fim*A با فیمبریه P و فیمبریه S گزارش شد (۵۵). از طرف دیگر، درمیان ۵۸ سویه بیوفیلم مثبت این مطالعه، ۴ سویه (۹۳ درصد) با اینکه فاقد ژنهای فیمبریه ای *fim*H، *pap*C، *sfa*S و *afa*I بودند، اما قابلیت ایجاد بیماری و تشکیل بیوفیلم داشتند که البته در میان آنها ۳ سویه (۷۵ درصد) بیوفیلم ضعیف بودند و ۲ سویه (۵۰ درصد) توانایی تولید کورلای را نداشتند (pdar).در مطالعه حاضر، ارتباط بین توانایی تولید کورلای و سلولز و تشکیل بیوفیلم با حضور ژنهای بیوفیلمی مورد بررسی قرار گرفت. فراوانی ژنهای *pap*C، *fim*H، *sfa*S و *afa*I در سویه های بیوفیلم قوی به ترتیب ۸۳، ۸۰، ۱۰ و ۷ درصد و در سویه های بیوفیلم ضعیف به ترتیب ۶۰، ۱۰، ۱۰ و ۰ درصد بود که

www.SID.ir

Archive of SID

نشان دهنده اختلاف معنی دار ژنهای *pap*C، *fim*H و *sfa*S در دو گروه بود. از طرف دیگر توانایی تولید بیوفیلم قوی در سویه های *fim*H مثبت (۵۹ درصد) و *pap*C مثبت (۵۴ درصد) بالاتر از سویه های فاقد این دو ژن بود (به ترتیب ۳۵ درصد و ۴۲ درصد)؛ درصورتیکه در مورد ژنهای *sfa*S و *afa*I، توانایی تولید بیوفیلم قوی در سویه های فاقد این دو ژن بیشتر از سویه های حامل این دو ژن بود که این نتایج درمجموع مؤید ارتباط بیشتر ژنهای *pap*C و *fim*H با توانایی تولید بیوفیلم قوی می باشد. البته اختلاف توانایی تولید بیوفیلم قوی در سویه های *fim*H مثبت و *pap*C مثبت نسبت به سویه های فاقد این دو ژن از نظر آماری معنی دار نبود. در مطالعه Samet و همکاران (۵۶)، ژنهای *csg*A و *fim*A و در مطالعه Soto و همکاران (۴۰)، فیمبریه نوع ۱ ارتباط معنی داری با توانایی تولید بیوفیلم نداشت. اما در مطالعه Naves و همکاران (۴۱)، ارتباط ژنهای *pap*C، *sfa*S، *hly*A و *cnf*-1 با توانایی تولید بیوفیلم قوی مورد بررسی قرار گرفت و شیوع بالاتر ژنهای *pap*C و *sfa*S در سویه های بیوفیلم قوی گزارش شد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان دهنده شیوع بالای سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مولد کورلای، سلولز و بیوفیلم در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری در بازه های سنی مختلف در شهر زاهدان است. تشکیل بیوفیلم توسط سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک منجر به شیوع بالا و بازگشت مکرر عفونت ادراری می شود. از طرف دیگر، عوارض شدید عفونت ادراری بر سلامتی افراد بیمار باعث صرف هزینه های درمانی بالایی شده که این عفونت را به یک مشکل بهداشت عمومی نگران کننده در سراسر جهان تبدیل کرده است. بررسی و تشخیص بیوفیلم، شناسایی مجموعه ژنهای مؤثر در تولید بیوفیلم و آگاهی از میزان شیوع این ژنها گام مهمی در انتخاب راهکارهای درمانی مناسب و طراحی واکسنهای کارآمد به منظور پیشگیری و کنترل این عفونت به شمار می رود.

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. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nature Reviews Microbiology. 2015 May;13(5):269-84.
2. Barber AE, Norton JP, Spivak AM, Mulvey MA. Urinary tract infections :current and emerging management strategies. Clinical Infectious Diseases 2013 Sep;57(5):719-24.
3. Salyers AA, Whitt DD. Book Review: Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach. 2nd ed. Washington DC: ASM Press; 2002 Sep.
4. Chromek M, Brauner A. Antimicrobial mechanisms of the urinary tract. Journal of Molecular Medicine 2008 Jan;86(1):37-47.

www.SID.ir

Archive of SID

5. Sobel J, D K. Urinary treat infections. 5th ed. Mandell G BJ, Dolin R, editors. New Yourk: Churchil-Livingstone; 2000 Sep.

6. Justice SS, Theriot JA, Hung C, Fletcher D.A, Anderson G.G, Footer M.J, et al. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004 Feb;101(5):1333-8.

7. Vollmerhausen T, Katouli M. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* and their role in development of urinary tract infection. In: K.E M, editor. Urinary Tract Infections: Epidemiology, Pathogenesis and Prevention: Nova Science Publishers, Inc; 2014 Apr. p. 33-88.

8. Prigent-Combaret C, Prensier G, Le Thi TT, Vidal O, Lejeune P, Dorel C. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. Environmental Microbiology. 2000 Aug;2(4):450-64.

9. Reisner A, Haagensen JA, Schembri MA, Zechner EL, Molin S. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. Molecular Microbiology. 2003 May;48(4):933-46.

10. Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Römling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. Molecular Microbiology. 2001 Mar;39(6):1452-63.

11. Dhakal BK, Kulesus RR, Mulvey MA. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. European Journal of Clinical Investigation. 2008 Oct;38(Suppl 2):2-11.

12. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clinical Microbiology Reviews 1991 Jan;4(1):80-128.

13. Mulvey MA. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. Cellular Microbiology. 2002 May;4(5):257-71.

14. Nowicki B, Selvarangan R, Nowicki S. Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. Journal of Infectious Diseases. 2001 Mar;183(Suppl:1):S24-S27.

15. MacFaddin JF. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Baltimore (Md.): Williams and Wilkins; 2000 Apr.

16. 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.

17. Vareille M, de Sablet T, Hindré T, Martin C, Gobert AP. 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

18. 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.

19. Stepanović S, Cirković I, Ranin L, Svabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Letters in Applied Microbiology. 2004 Apr;38(5):428-32.

20. Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 1995 Oct;12(2):85-90.

21. Silva VO, Espeschit IF, Moreira MA. Clonal relationship of *Escherichia coli* biofilm producer isolates obtained from mastitic milk. Canadian Journal of Microbiology. 2013 May;59(5):291-3.

22. Bauer RJ, Zhang L, Foxman B, Siitonen A, Jantunen ME, Saxen H, et al. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-*usp*, *iha*, and *iro*N(*E. coli*). The Journal of Infectious Diseases. 2002 May;185(10):1521-1524.

23. Snyder J, Haugen B, Lockatell CV, Maroncle N, Hagan E, Johnson D, et al. Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. Infection and Immunity. 2005 Nov;73(11):7588-96.

24. 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.

25. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999 May;284(5418):1318-22.

26. El-Shekh NA, Ayoub AMA, El-Hendawy HH, Abada EA, Khalifa SYE. In vitro activity of some antimicrobial agents against intact and disrupted biofilms of staphylococci in the indwelling vascular catheter patients. World Applied Sciences Journal. 2010 Apr;10(1):108-20.

27. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. 2001 Jul;358(9276):135-8.

28. Sahm DF, Thornsberry C, Mayfield DC, Jones ME, Karlowsky JA. Multidrug-resistant urinary tract isolates of *Escherichia coli*: prevalence and patient demographics in the United States in 2000. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2001 May;45(5):1402-6.

29. Pratt LA, Kolter R. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. Current Opinion in Microbiology. 1999 Dec;2(6):598-603.

30. Vidal O, Longin R, Prigent-Combaret C, Dorel C, Hooreman M, Lejeune P. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. Journal of Bacteriology. 1998 May;180(9):2442-9.

www.SID.ir

Archive of SID

31. Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, Soto S, Horcajada JP, Jimenez de Anta MT, et al. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. The Journal of Infectious Diseases. 2005 Jan;191(1):46-50.

32. Rahimi F, Katouli M, Karimi S. Biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from catheterized patients with urinary tract infection. Microbial Pathogenesis. 2016;98:69-76.

33. Da Re S, Valle J, Charbonnel N, Beloin C, Latour-Lambert P, Faure P, et al. Identification of commensal *Escherichia coli* genes involved in biofilm resistance to pathogen colonization. PLoS One. 2013 May;8(5):e61628.

34. Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S. In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. Journal of Bacteriology. 2006 May;188(10):3572-81.

35. White-Ziegler CA, Um S, Pérez NM, Berns AL, Malhowski AJ, Young S. Low temperature (23 degrees C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12. Microbiology. 2008 Jan;154:148-66.

36. Miyazaki J, Ba-Thein W, Kumao T, Obata Yasuoka M, Akaza H, Hayshi H. Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere to and invade bladder epithelial cells. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2002 Mar;33(1):23-6.

37. Amin M, Mehdinejad M, Pourdangchi Z. Study of bacteria isolated from urinary tract infections and determination of their susceptibility to antibiotics. Jundishapur Journal of Microbiology. 2009 Sep;2(3):118-23.

38. Bazar M. Urinary tract infection. 2nd ed. New York: Williams and Wilkins; 1993 Jan.

39. Bokranz W, Wang X, Tschäpe H, Römling U. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. Journal of Medical Microbiology. 2005 Dec;54(12):1171-82.

40. Soto SM, Smithson A, Martinez JA, Horcajada JP, Mensa J, Vila J. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. The Journal of Urology. 2007 Jan;177(1):365-8.

41. Naves P, del Prado G, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, Blanco J, et al. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. Microbial Pathogenesis. 2008 Aug;45(2):86-91.

42. 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

Archive of SID

43. Römling U, Bian Z, Hammar M, Sierralta WD, Normark S. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. Journal of Bacteriology. 1998 Feb;180(3):722-31.

44. Frömmel U, Lehmann W, Rödiger S, Böhm A, Nitschke J, Weinreich J, et al. Adhesion of human and animal *Escherichia coli* strains in association with their virulence-associated genes and phylogenetic origins. Applied and Environmental Microbiology. 2013 Oct;79(19):5814-29.

45. Reisner A, Maierl M, Jörger M, Krause R, Berger D, Haid A, et al. Type 1 fimbriae contribute to catheter-associated urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 2014 Mar;196(5):931-9.

46. Wang MC, Tseng CC, Wu AB, Lin WH, Teng CH, Yan JJ, et al. Bacterial characteristics and glycemic control in diabetic patients with *Escherichia coli* urinary tract infection. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2013 Feb;46(1):24-9.

47. Yun KW, Kim HY, Park HK, Kim W, Lim IS. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2014 Dec;47(6):455-61.

48. Arisoy M, Aysev D, Ekim M, Özel D, Köse S.K, Özsoy ED, et al. Detection of virulence factors of *Escherichia coli* from children by multiplex polymerase chain reaction. International Journal of Clinical Practice. 2006 Jul;60:170-3.

49. Santo E, Macedo C, Marin JM. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a university hospital in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 2006 Jul-Aug;48(4):185-8.

50. Nazemi A, Naderi M, Jafarpour M, Miri Nargesi MS, Sharifi S. Distribution of fimbriae genes encoding in *E. coli* isolated from patients with urinary tract infection. Laboratory Journal. 2011 Oct;4(2):121-9.

51. Arabi Sh, Tohidi F, Naderi S, Nazemi A. The common fimbarie genotyping in uropathogenic *Escherichia coli*. Annals of Biological Research 2012 Apr;3(10):4951-4.

52. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpoor Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2013 Apr;12:8.

53. Tiba MR, Yano T, Leite Dda S. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 2008 Sep-Oct;50(5):255-60.

54. Rijavec M, Müller-Premru M, Zakotnik B, Žgur-Bertok D. Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. Journal of Medical Microbiology. 2008 Nov;57:1329-34.

www.SID.ir

Archive of SID

55. Johnson JR, Kuskowski MA, O'bryan TT, Colodner R, Raz R. Virulence genotype and phylogenetic origin in relation to antibiotic resistance profile among *Escherichia coli* urine sample isolates from Israeli women with acute uncomplicated cystitis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2005 Jan;49(1):26-31.

56. Samet M, Ghaemi E, Jahanpur S, Jamalli A. Evaluation of biofilm-forming capabilities of urinary *Escherichia coli* isolates in microtiter plate using two different culture media. International Journal of Molecular and Clinical Microbiology. 2013 Jun;3(1):244-7.

www.SID.ir