بررسی فراوانی فاکتورهای ویرولانس در جدایه‌های یوروپاتوژنیک اشریشیا کلی تولیدکننده و غیرتولیدکننده بیوفیلم جداشده از بیماران دیابتی در شهرکرد

دانشجوی حسین خدابنده شهرکی[1]، الهه تاج‌بخش[2*]، ابراهیم رحیمی[3]

۱. دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳. استاد، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۰۱)

چکیده

سویه‌های *اشریشیا کلی* عامل عفونت ادراری به گروه *اشریشیا کلی* بیماری‌زای خارج گوارشی تعلق دارند که فاکتورهای حدت مختلفی را بروز می‌دهند که کلونیزاسیون، تهاجم و متعاقب آن کاهش پاسخ دستگاه ایمنی میزبان را سبب می‌شوند. در این مطالعه ۳۰۰ نمونه ادرار بیماران دیابتی مشکوک به عفونت ادراری مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان شهرکرد جمع آوری شد. با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد، ۵۱ جدایه *اشریشیاکلی* تأیید گردید. جهت بررسی تشکیل بیوفیلم از روش میکروتیتر پلیت استفاده شد. پس از استخراج DNA، حضور ژن‌های فیمبریا *afa*، *pap*، *sfa*، *fimH* به روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها نشان داد از ۵۱ جدایه *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک ۴۶ جدایه (۹۰/۱۶٪) قادر به تولید بیوفیلم بودند واکنش تولید بیوفیلم مشاهده گردید، فراوانی ژن‌های*fimH*،*pap*، *sfa* و *afa* در جدایه‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم قوی می‌باشند به ترتیب ۹۰٪، ۸۰٪، ۸۰٪ و ۱۰٪، در جدایه‌هایی که بیوفیلم متوسط تولید می‌کردند، ۸۳/۳۳٪، ۷۵٪، ۱۵٪ و ۴۱/۶۶٪ و در جدایه‌هایی‌که بیوفیلم ضعیف تولید می‌کردند ۷۵٪، ۶۶/۶۶٪، ۴۵/۸۳٪ و ۳۳/۳۳٪ گزارش گردید. یافته‌های تحقیق نشانگر اهمیت ژن‌های ویرولانس در جدایه‌های تولید کننده بیوفیلم *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که شیوع ژن‌های ویرولانس *fimH* و *pap* در میان جدایه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک جدا شده از بیماران دیابتی در منطقه ما بالا می‌باشد.

کلیدواژگان

اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک، بیماران دیابتی، بیوفیلم، ژن‌های ویرولانس، عفونت ادراری.

* نویسنده مسئول، رایانامه: ee_tajbakhsh@yahoo.com

مقدمه

باکتری اشریشیا کلی جزئی از فلور طبیعی روده است، اما برخی مواقع این باکتری با تهاجم به سایر بافت‌ها ایجاد بیماری می‌کند (۱،۲). این پاتوژن مسئول ایجاد چندین نوع عفونت بالینی مانند بیماری‌های انتریک و اسهالی، عفونت‌های دستگاه ادراری[1]، سپسیس و مننژیت می‌باشد. سویه‌های بیماری‌زای اشریشیا کلی به چندین پاتوتایپ تقسیم می‌شوند. عفونت‌های خارج روده‌ای به‌وسیله پاتوتایپ-های مجزا از این باکتری ایجاد می‌شوند. سویه‌های یوروپاتوژنیک عامل اولیه عفونت دستگاه ادراری در کشورهای توسعه یافته می‌باشند. این بیماری عفونی معمولاً با عفونت مثانه شروع می‌شود اما اغلب با فرا گرفتن کلیه‌ها توسعه پیدا می‌کند و سرانجام ممکن است منجر به نارسایی کلیوی شود و حتی به خون هم راه یابد. توانایی سویه‌های یوروپاتوژنیک[2] برای ایجاد عفونت علامت‌دار دستگاه ادراری به چسبندگی و اتصال این سویه‌ها به سلول‌های بافت پوششی مجاری ادراری که توسط ادهزین‌های فیمبریه‌ای و غیر فیمبریه‌ای صورت می‌پذیرد، بستگی دارد. ادهزین‌ها به گیرنده‌های موجود در سطح سلول‌ها متصل شده و مقدمات عفونت‌های ادراری را فراهم می‌کنند (۵-۳). اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک می‌تواند انواع متفاوتی از فیمبریه‌های لازم برای تشخیص و اتصال به گیرنده‌های مجاری ادراری را تولید کند که شامل فیمبریه تیپ ۱ است که توسط ژن fim کد می‌شود، P فیمبریه که توسط ژن‌های pap ۳کد می‌شود، S فیمبریه که توسط ژن‌های sfa کد می‌شود و چسبنده Afa که توسط ژن‌های afa کد می‌شود (۸-۶). در این بین شناخته شده‌ترین ادهزین‌های فیمبریه‌ای در اشریشیا کلی فیمبریه نوع ۱ و فیمبریه pap است. فیمبریه نوع ۱ از نوع حساس به مانوز است که توسط بیش از ۸۰٪ سویه‌های UPEC عامل سیستیت بیان می‌گردد و این در حالی است‌که P فیمبریه بیشتر در ارتباط با ایجاد موارد پیلونفریت سویه‌های حامل است. بیان و مونتاژ فیمبریه نوع ۱ توسط مجموعه ژنی fim مشتمل بر ۹ ژن انجام می‌شود که در این بین fimH برای جذب و اتصال باکتری به گیرنده سلولی یورپلاکین موجود بر سلول-های بافت پوششی دستگاه ادراری در مثانه مهم و ضروری است (۹،۱۰). از آن‌جاکه پروتئین fimH فاقد تنوع ژنتیکی است، از این رو در بیشتر مطالعات انجام شده در مورد تهیه واکسن علیه عفونت ادراری، این پروتئین مد نظر بوده است (۱۰،۱۱). بیماری دیابت از جمله شایع‌ترین و مهم‌ترین بیماری‌ها می‌باشد که شیوع و بروز آن در جوامع مختلف، متفاوت است. دیابت به‌علت ایجاد ناهنجاری‌هایی در سیستم دفاعی میزبان، سبب مستعد شدن ابتلای فرد به عفونت ادراری می‌شود. این نقایص شامل آسیب به عملکرد گلبول‌های سفید از جمله مهاجرت، فاگوسیتوز و کموتاکسی هستند. هم‌چنین عوارض نوروپاتی سبب نقص در تخلیه کامل مثانه و در نتیجه ایجاد عفونت ادراری می‌شود (۱۵-۱۲). با توجه به شیوع عفونت‌های ادراری در جامعه، ضرورت انجام غربالگری، تشخیص و درمان به موقع بیماران از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد به این دلیل که با سهل انگاری در درمان این عفونت، مشکلات جبران ناپذیری در آینده برای بیمار رخ خواهد داد. بنابراین تحقیق حاضر با هدف بررسی فراوانی فاکتورهای ویرولانس در جدایه‌های یوروپاتوژنیک اشریشیا کلی تولیدکننده و غیرتولیدکننده بیوفیلم جداشده از بیماران دیابتی در شهرستان شهرکرد صورت پذیرفته است که با دانستن

[1] Urinary Tract Infection (UTI)
[2] Uropathogenic E. coli (UPEC)
[3] Phylonephritis associated Pili

میزان شیوع این ژن‌ها در جامعه و با توجه به نقش مهم و ضروری آن‌ها در ایجاد عفونت می‌توان به فکر طراحی واکسن‌هایی علیه این فیمبریه در جدایه‌های افتاد.

مواد و روش‌ها

الف) جدایه‌های باکتریایی

در این مطالعه توصیفی- مقطعی ۳۰۰ نمونه ادراری در فاصله زمانی فروردین تا شهریور ۱۳۹۴ از افراد دیابتی مبتلا به عفونت ادراری پس از جمع آوری از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرکرد به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، منتقل و جهت کشت بر روی محیط‌های مک کانکی آگار و ائوزین متیلن بلو آگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت کلنی‌ها بررسی و با آزمون‌های تشخیصی و تکمیلی بیوشیمیایی جدایه‌های *اشریشیا کلی* شناسایی و تأیید گردیدند (۱۶).

ب) بررسی تولید بیوفیلم در جدایه‌های باکتریایی به روش میکروتیتیر پلیت

جهت بررسی تشکیل بیوفیلم از روش میکروتیتر پلیت استفاده شد. ابتدا یک لوپ پر از کلنی باکتری را به یک لوله حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط تریپتیک سوی براث Tryptic Soy Broth (TSB) تلقیح و این لوله‌ها به‌مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. بعد از گذشت این مدت و فعال شدن باکتری‌ها، ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری را برداشته و به لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط استریل تریپتیک سوی براث تلقیح گردید. سپس ۲۰۰میکرولیتر از محیط ۱۰ میلی‌لیتری را برداشته و داخل چاهک‌های میکروتیتر پلیت ریخته شد. در چاهک شاهد فقط محیط کشت استریل TSBریخته شد. جنس میکروتیتر پلیت‌ها از پلی‌استیرن است و هر کدام دارای ۸ ردیف و ۱۲ ستون می‌باشد. بعد از تلقیح درب پلیت‌ها را گذاشته و انکوباسیون به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. بعد از گذشت این مدت، محتوی داخل چاهک‌ها خالی شد و شستشوی چاهک‌ها ۳ بار با سرم فیزیولوژی استریل انجام شد. پلیت‌ها به‌شدت تکان داده شدند تا سلول‌های غیر متصل حذف شوند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ به چاهک‌ها اضافه گردید تا سلول‌ها تثبیت گردند. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه، محتویات چاهک‌ها تخلیه شد و در دمای آزمایشگاه سطح پلیت‌ها خشک شد. سپس هر چاهک با۲۰۰ میکرولیتر از کریستال ویوله ۲٪ به‌مدت ۵ دقیقه رنگ شد. پس از ۵ دقیقه، چاهک‌ها با آب شهری به آرامی شسته شد و با ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳٪ به‌عنوان حلال پر گردید و بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب نوری چاهک‌های رنگ شده با کریستال ویوله در ۶۲۰ نانومتر توسط دستگاه قرائت کننده الایزا خوانده شد. که بر اساس OD در سه گروه قوی، متوسط و ضعیف طبقه‌بندی شدند. به طوری‌که جدایه‌هایی که OD مساوی یا بالاتر از ۰/۳ داشتند به‌عنوان بیوفیلم قوی، در صورتی‌که OD بین ۰/۲ تا ۰/۲۹۹ داشتند به‌عنوان بیوفیلم متوسط، در صورتی‌که OD بین ۰/۱ تا ۰/۱۹۹ داشتند به‌عنوان بیوفیلم ضعیف و در صورتی‌که OD کمتر از ۰/۱ داشتند بیوفیلم منفی نظر گرفته شدند. در این تحقیق از سویه استاندارد *اشریشیا کلی* ATCC 25922 به عنوان کنترل مثبت جهت تشخیص بیوفیلم استفاده گردید (۱۷، ۱۸).

ج) استخراج DNA و تائید مولکولی جدایه‌های باکتریایی

جهت استخراج DNA جدایه‌ها از روش جوشاندن

(Boiling Method) استفاده شد. بدین منظور یک لوپ کامل از کشت ۲۴ ساعته باکتری روی محیط پپتون واتر (مرک، آلمان) در یک میکروتیوپ حاوی ۵۰۰ میکرولیترآب مقطر استریل حل گردید و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد (۱۹).

به‌منظور تائید قطعی *اشریشیا کلی* در جدایه‌های مورد مطالعه آزمون PCR با استفاده از زوج پرایمرهای جدول ۱ با ردیابی ژن *16srRNA* باکتری انجام گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (فرمنتاز، لیتوانی)، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای F و R (سیناژن، ایران)، ۰/۲ میکرولیتر DNA Taq Polymeras، ۱۸/۰۵ ddH_2O صورت گرفت. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر گرادیانت (Eppendorf Master Cycler Gradient, Germany) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه انجام شد (۱۹).

جدول ۱- توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* در جدایه‌های *اشریشیا کلی* (۱۹)

ژن	توالی پرایمر(۳َ-۵َ)	اندازه محصول(bp)
16srRNA	GCGGACGGGTGAGTAATGT TCATCCTCTCAGACCAGCTA	۲۰۰

د)آزمایش PCR جهت تشخیص ژن‌هـای *pap, sfa, afa* درجدایه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک

برای اثبات حضور ژن‌های *afa*، *sfa* و *pap* در جدایه‌های *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک از پرایمرهای موجود در جدول ۲ استفاده شد. واکنش PCR جهت ردیابی ژن‌های *afa*، *sfa* و *pap* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (فرمنتاز، لیتوانی)، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای F و R (سیناژن، ایران)، ۰/۳ میکرولیتر DNA Taq Polymeras، ddH_2O۱۶/۹۵ صورت گرفت. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر گرادیانت با شرایط دمایی ۱ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد (۲۰).

ه)آزمـــایش PCR جهـــت تشـــخیص ژن fimH در جدایه‌های اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک

برای اثبات حضور ژن *fimH* در جدایه‌های اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک از پرایمرهای موجود در جدول ۲ استفاده شد. واکنش PCR جهت ردیابی ژن *fimH* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (فرمنتاز، لیتوانی)، ۰/۷۵ میکرولیتر

$MgCl_2$، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای F و R (سیناژن، ایران)، ۰/۲ میکرولیتر aqPolymeras DNA، ddH_2O ۱۸/۰۵ صورت گرفت. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر گرادیانت (Eppendorf Master Cycler Gradient, Germany) با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت‌شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۴۰ چرخه شامل واسرشت‌شدن در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به‌مدت ۶۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶ دقیقه انجام شد (۲۰).

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص ژن‌های ویرولانس در جدایه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک تولید کننده بیوفیلم (۲۰)

ژن	نام پرایمر	توالی پرایمر (۳َ-۵َ)	اندازه محصول(bp)
pap	*pap3* *pap4*	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	336
fimH	*FimH1* *FimH2*	GAGAAGAGGTTTGATTTAACTTATTG AGAGCCGCTGTAGAACTGAGG	559
sfa	*sfa1* *sfa2*	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410
afa	*afa1* *afa2*	GCTGGGCAGCAAACTGATAACTCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	750

بعد از آزمایشات PCR، محصول PCR روی ژل۲ درصد آگارز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمنتاز،آلمان) الکتروفورز و نتیجه با دستگاه تصویر بردار از ژل (انگلستان،Uviteck) بررسی شد.

یافته‌ها

مطالعه حاضر بر روی ۳۰۰ نمونه ادرار بیماران مبتلا به دیابت ملیتوس نوع ۲ مشکوک به عفونت ادراری، مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرکرد در سال ۱۳۹۴ صورت گرفت که از این تعداد۷۰ زن (۷۰٪) و ۳۰ مرد (۳۰٪) بودند.پس از انجام بررسی‌های میکروب شناسی بر اساس منابع معتبر ۵۱ جدایه اشریشیا کلی جدا شد؛ به عبارت دیگر شیوع UTI ایجاد شده توسط این باکتری ۵۱٪ برآورد گردید. از ۷۰ بیمار دیابتیک زن مبتلا به عفونت ادراری، آلودگی به اشریشیا کلی در ۳۸ نمونه (۷۴/۵۰٪) و از ۳۰ بیمار دیابتیک مرد مبتلا به عفونت ادراری، آلودگی به اشریشیا کلی در ۱۳ نمونه (۲۵/۴۹٪) گزارش گردید.

نتایج مربوط به آزمایش تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیترپلیت

در روش میکروتیتر پلیت به‌منظور تشکیل بیوفیلم از ۵۱ جدایه اشریشیا کلی جدا شده از عفونت‌های ادراری در شهرستان شهرکرد، ۴۶ جدایه (۹۰/۱۶٪) قادر به تولید بیوفیلم بودند که بر اساس OD در سه گروه قوی، متوسط و ضعیف طبقه‌بندی شدند. ۱۰ جدایه (۱۹/۶۰٪) واکنش بیوفیلم قوی، ۱۲ جدایه (۲۳/۵۲٪) واکنش بیوفیلم متوسط، ۲۴ جدایه (۴۹٪) واکنش بیوفیلم ضعیف نشان داده شد. در ۵ جدایه (۹/۸٪) واکنش بیوفیلم منفی مشاهده شد. نتایج آزمایش تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های اشریشیا کلی در جنس زن و مرد در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳- نتایج مربوط به آزمایش تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های *اشریشیا کلی* در جنس زن و مرد

	فاقد بیوفیلم	ضعیف	متوسط	قوی	P-value
زن	۲ (٪۵/۳)	۱۹ (٪۵۰)	۸ (٪۲۱/۱)	۹ (٪۲۳/۶)	۰/۳۹۱
مرد	۲ (٪۱۵/۴)	۴ (٪۳۰/۸)	۴ (٪۳۰/۸)	۳ (٪۲۳)	

در تجزیه و تحلیل آماری بر اساس آزمون دقیق فیشر بین جنسیت و واکنش بیوفیلم ارتباط آماری مشاهده نگردید (p-value>0/05)

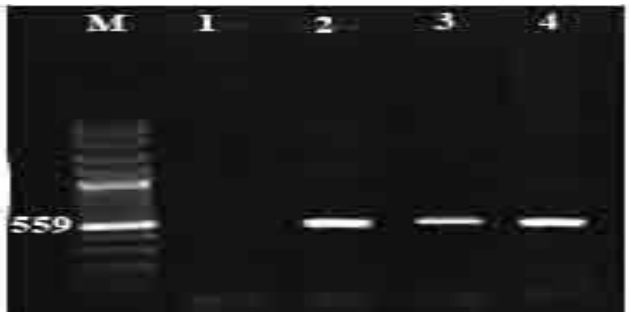
از نظر گروه‌های سنی افراد مورد مطالعه در این تحقیق به ۴ گروه ۴۹-۴۰، ۵۹-۵۰، ۶۹-۶۰ و بالای ۷۰ سال تقسیم شدند. از ۱۳ جدایه جدا شده در جنسیت مرد در سن ۴۹-۴۰ سال ۲ نمونه (٪۱۵/۴)، در سن ۵۹-۵۰ سال ۴ نمونه (٪۳۰/۸)، در سن ۶۹-۶۰ سال ۵ نمونه (٪۳۸/۵) و در سن بالای ۷۰ سال ۲ نمونه (٪۱۵/۴) آلودگی به *اشریشیا کلی* گزارش گردید.از ۳۸ جدایه جدا شده در جنسیت زن در سن ۴۹-۴۰ سال در ۸ نمونه (٪۲۱/۱)، در سن ۵۹-۵۰ سال در ۹ نمونه (٪۲۳/۷)، در سن ۶۹-۶۰ سال در ۱۸ نمونه (٪۴۷/۴) و در سن بالای ۷۰ سال در ۳ نمونه (٪۷/۹) *اشریشیا کلی* گزارش گردید.

نتایج مربوط به فراوانی ژن‌هـای *fimH*،*pap*،*sfa* و *afa* در جدایه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک

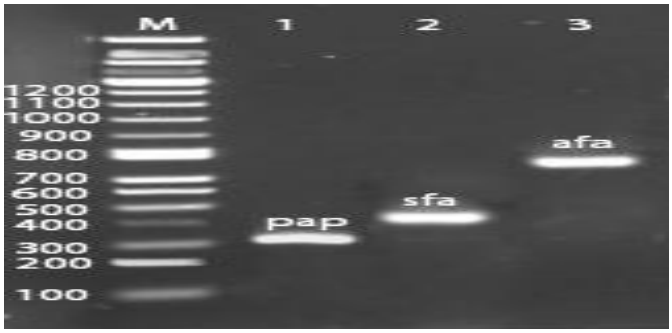
فراوانی ژن‌های *fimH*،*pap*،*sfa* و *afa* درجدایه‌های *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک در جدول ۴، شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین ژن‌های *pap*، *sfa* و *afa* و واکنش بیوفیلم ارتباط آماری معنی‌دار مشاهده نگردید (p-value=0/953>0/05)). در صورتی که بین واکنش بیوفیلم قوی و ژن *fimH* ارتباط آماری معنی-دار مشاهده گردید (p-value=0/000<0/05).

جدول٤- فراوانی ژن‌های *fimH*،*pap*،*sfa* و *afa* درجدایه‌های اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک

ژن	واکنش بیوفیلم			
	فاقد بیوفیلم	بیوفیلم ضعیف	بیوفیلم متوسط	بیوفیلم قوی
	۵	۲۴	۱۲	۱۰
fimH	۳ (٪۶۰)	۱۸ (٪۷۵)	۱۰ (٪۸۳/۳۳)	۹ (٪۹۰)
pap	۲ (٪۴۰)	۱۶ (٪۶۶/۶۶)	۸ (٪۷۵)	۸ (٪۸۰)
sfa	۲ (٪۴۰)	۱۱ (٪۴۵/۸۳)	۶ (٪۵۰)	۸ (٪۸۰)
afa	۱ (٪۲۰)	۸ (٪۳۳/۳۳)	۵ (٪۴۱/۶۶)	۱۰ (٪۱۰)



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن *fimH*: ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱: کنترل منفی، ستون‌های (٤-۲) نمونه‌های مثبت واجد باند ۵۵۹ جفت بازی ژن *fimH*



شکل ۲- الکتروفورز محصولات PCR ژن‌های*sfa،pap* و *afa*: ستون M: مارکر۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱: باند ۳۳۶ جفت بازی ژن *pap*، ستون ۲: باند ٤۱۰ جفت بازی ژن *sfa*، ستون ۳: باند ۷۵۰ جفت بازی ژن *afa*.

بحث

اشریشیا کلی عامل بیش از ۸۰ درصد موارد عفونت ادراری در تمام رده‌های سنی است (۲۲،۲۱). درمان نامناسب عفونت ادراری با گذشت زمان می‌تواند باعث نارسایی کلیوی شود (۲۳). فاکتورهای ویرولانس مختلفی به پاتوژنسیته UPEC نسبت داده می‌شود (۲۴). آگاهی بهتر از خصوصیات ویرولانس ارگانیسم پاتوژن به پزشک این امکان را می‌دهد که روند پیشرفت عفونت در میزبان و درمان مناسب آن را پیش‌بینی کند (۲۳). شیوع باکتری *اشریشیا کلی* در نمونه ادرار بیماران دیابتی مورد مطالعه ما ۵۱٪ بود هم‌چنین مطالعه بهروزی و همکارانش نیز نشان می‌دهد که باکتری *اشریشیا کلی* پاتوژن غالب جدا شده از نمونه‌های ادرار است (۲۵). شیوع عفونت ادراری در نقاط مختلف دنیا متفاوت است (۲۶) هر چند مطالعه Akoacher و همکارانش در سال ۲۰۱۲ در کامرون نشان داد که بین شیوع UTI و محل مطالعه ارتباطی دیده نمی‌شود (۲۷). به‌طورکلی شیوع عفونت ادراری در مطالعه ما در زنان شایع‌تر از مردان است که این می‌تواند به‌خاطر تفاوت در آناتومی مجاری ادراری آن‌ها باشد که این نتیجه در مطالعات دیگر نیز دیده شده است (۲۹،۲۸). بیماران مبتلا به دیابت در مقایسه با بیماران غیر دیابتی، چندین برابر بیشتر در معرض خطر ابتلاء به عفونت‌های ادراری هستند. مطالعه انجام شده روی اتوپسی‌ها در سال

۱۹۴۰ نشان داد که ۱۸٪ از بیماران مبتلا به دیابت به عفونت ادراری مبتلا بودند (۱۲). برخلاف آقایان، شیوع عفونت‌های ادراری بدون علامت، در زنان مبتلا به دیابت نسبت به زنان غیر دیابتی بیشتر است. علاوه بر این عفونت‌های ادراری با علامت نیز در بیماران مبتلا به دیابت بالاتر است. عوارض ناشی از عفونت-های ادراری از قبیل باکتریمی، آبسه کلیه و نکروز کلیه در افراد مبتلا به دیابت بیشتر است. حتی گرفتاری کلیوی بدون علامت مانند پیلونفریت تحت حاد، در این بیماران شایع تر است (۳۰).با این وجود عوامل خطرزای عفونت ادراری در زنان مبتلا به دیابت به خوبی تعریف نشده است و مطالعات مختلف، عوامل مختلفی را به‌عنوان عوامل خطرزا معرفی کرده اند (۳۱). سن، کنترل متابولیک، طول مدت زمان ابتلاء به دیابت، سیستوپاتی دیابتی، فعالیت جنسی، ماکروآلبومینوری، میزان کراتینین سرم، اقامت‌های مکرر در بیمارستان و استفاده زیاد از کاتترهای ادراری و واژینیت را به عنوان عوامل مؤثر در افزایش میزان عفونت‌های ادراری در افراد مبتلا به دیابت گزارش کرده اند (۱۲، ۳۱، ۳۲). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میان سن و جنس با بروز عفونت‌های ادراری ارتباط معنی‌داری وجود دارد(p-value=0/012<0/05). در مطالعه گریلینگز و همکاران نیز سن زیاد، به‌عنوان یک عامل خطر برای بروز عفونت ادراری در زنان دیابتی، معرفی شده است اما یافته‌های سایر محققین مانند ایشی و برومند وجود ارتباط معنی دار میان سن و ابتلاء به عفونت‌های ادراری در زنان مبتلا به دیابت را نشان نداده است (۳۱-۳۲).

در این مطالعه بین جنسیت و واکنش بیوفیلم با (p-value>0/05) و بین ژن‌های *pap*، *sfa*و*afa* و واکنش بیوفیلم با (p-value=0/953>0/05) ارتباط آماری معنی دار مشاهده نگردید. در صورتی‌که بین واکنش بیوفیلم قوی و ژن *fimH* ارتباط آماری معنادار مشاهده گردید (p-value=0/000<0/05). توانایی تشکیل بیوفیلم نقش مهمی در ویرولانس این باکتری دارد. این باکتری پلی‌ساکارید خارج سلولی تولید می‌کند که باعث تشکیل بیوفیلم می‌شود. این ساختار در ایجاد عفونت‌های این باکتری بسیار مؤثر می‌باشد. بیوفیلم باکتریایی، جامعه‌ای از باکتری‌های چسبنده و رشد کننده بر سطوح جاندار یا بی‌جان محصور در یک ماتریکس پلی‌ساکاریدی می‌باشد. تشکیل بیوفیلم منافع زیادی برای ارگانیسم متشکله دارد، از جمله حفاظت آن‌ها در برابر سیستم ایمنی میزبان، مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و ضدعفونی‌کننده‌ها، حفظ و نگهداری محیط فیزیکی شیمیایی مناسب برای رشد و بقاء میکروارگانیسم؛ بنابراین آن‌ها قادرند در شرایط نامساعد محیطی مقاومت کرده و به حیات خود ادامه دهند. با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیوفیلم باکتری‌ها نسبت به حالت پلانکتونیک، این مسئله اهمیت بررسی و تشخیص بیوفیلم در عفونت ایجادشده و لحاظ این مسئله را در درمان نشان می‌دهد (۳۳).

در تحقیق ما از ۵۱ جدایه *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک ۴۶ جدایه (۹۰/۱۶٪) قادر به تولید بیوفیلم بودند که ۱۰ جدایه (۱۹/۶۰٪) واکنش بیوفیلم قوی، ۱۲ جدایه (۲۳/۵۲٪) واکنش بیوفیلم متوسط، ۲۴ جدایه (۴۹٪) واکنش بیوفیلم ضعیف نشان داده شد. در ۵ جدایه (۹/۸٪) واکنش بیوفیلم منفی مشاهده شد.عامل اتصال و تشکیل بیوفیلم در اشریشیا کلی یوروپاتوژن جدا شده از ۷۰ بیمار مبتلا به عفونت ادراری در استان سمنان نشان داد که باکتری *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن با هیدروفوبیسیتی ۲۳٪ توانایی تشکیل بیوفیلم را دارد که در این میان، ۲۰٪ قدرت بسیار کم، ۱۶٪ قدرت متوسط و ۶۰٪ قدرت بسیار بالایی برای تشکیل بیوفیلم داشته و فقط ۴٪ فاقد این قدرت بودند (۳۴).Ponnusamy و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که ۲۳/۶٪ جدایه‌ها از

نظر توانایی تشکیل بیوفیلم قوی بودند (۳۵) که در مقایسه با تحقیق حاضر، میزان تشکیل بیوفیلم بیشتری از خود نشان دادند. این مسأله می‌تواند به‌علت پائین بودن سطح بهداشت، افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی و منابع جداسازی نمونه‌ها باشد.

فراوانی ژن‌های *fimH*،*pap*،*sfa*و*afa* در جدایه‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم قوی می‌باشند به ترتیب ۹۰٪، ۸۰٪، ۸۰٪ و ۱۰٪، در جدایه‌هایی که بیوفیلم متوسط تولید می‌کردند، ۸۳/۳۳٪، ۷۵٪، ۱۵٪ و ۴۱/۶۶٪ و در جدایه‌هایی که بیوفیلم ضعیف تولید می‌کردند ۷۵٪، ۶۶/۶۶٪، ۴۵/۸۳٪ و ۳۳/۳۳٪ گزارش گردید.*FimH* برای جذب باکتری به داخل سلول‌های اپی‌تلیال مثانه لازم است. *FimH* می‌تواند مشابه مولکول پروتئینی اینویزین در *یرسینیا سودوتوبرکلوزیس* و اینترنالین A در *لیستریا مونوسایتوژنز* عمل نماید. تهاجم به واسطه *FimH* به سلول‌های اپی‌تلیال مثانه نیاز به فعال‌سازی آبشار سیگنال ترانس داکشن با استفاده از پروتئین تیروزین کیناز، فسفواینوزیتید ۳ کیناز و بازآرایی اکتین اسکلت سلولی در میزبان دارد. ادهسین *FimH* یوروپلاتین‌های مانوزیلاته و گیرنده‌های اینتگرین ۱-β و۳-α را از روی سطح لومنی سلول‌های یوروتلیال مثانه شناسایی می‌کنند (۳۶).

مطالعات متعددی نشان دهنده نقش ژن *fimH* در ایجاد عفونت‌های ادراری می‌باشند، به‌طوری‌که در مطالعه انجام شده توسط شجاعیان و همکاران در سال ۱۳۹۲ حضور ژن *fimH* به روش PCR در ۷۰ نمونه ادراری از بیماران مبتلا به عفونت مجرای ادراری مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق ۴۲ نمونه باکتری *اشریشیا کلی* آلوده تشخیص داده شد که ۱۲ نمونه (۲۸/۶٪) دارای سنگ کلیه و ۳۰ نمونه (۷۱/۴ ٪) فاقد سنگ کلیه بودند. از ۱۲ نمونه افراد مبتلا به سنگ کلیه، ۸ نمونه (۶۶/۷٪) دارای ژن *fimH* و ۴ نمونه (۳۳/۳٪ ٪) فاقد ژن *fimH* بودند. به این ترتیب مشخص گردید ژن *fimH* فاکتور بیماری‌زای مهمی در مبتلایان به عفونت مجرای ادراری است (۳۷). در تحقیق دیگر در سال ۲۰۰۱، Usein و همکارانش ۷۸ باکتری *اشریشیا کلی* جدا شده از مبتلایان به عفونت مجرای ادراری را بررسی نمودند و شیوع ژن *fimH* را ۸۶٪ اعلام کردند (۳۸). در مطالعه‌ای که توسط Rijavec و همکاران در سال ۲۰۰۸ در اسلوونی بر روی ۱۰۵ جدایه *اشریشیا کلی* جدا شده از عفونت مجاری ادراری انجام شد، تولید بیوفیلم در۵۵ جدایه (۵۳ درصد) گزارش گردید. میزان شیوع ژن‌های فیمبریه *fimH*،*papC*،*sfa/foc*، *afa* به ترتیب در ۹۵٪، ۵۵٪، ۲۴٪ و ۳٪ از جدایه‌ها گزارش شد. در این تحقیق نیز مشابه تحقیق ما *fimH* و بعد از آن *pap* از بیشترین فراوانی برخوردار می‌باشد (۳۴).در مطالعه Marhova و همکاران (۲۰۱۰) در بلغارستان، توانایی ساخت بیوفیلم در باکتری‌های *اشریشیا کلی* ناشی از عفونت‌های مجاری ادراری بررسی شد. در مجموع ۵۰ جدایه *اشریشیا کلی* از بیماران جمع‌آوری شد و تولید بیوفیلم در ۳۶٪ از جدایه‌ها تشخیص داده شد، هم‌چنین ۲۴٪ از جدایه‌ها از نظر ژن *hly* و ۱۶٪ از نظر ژن*fim1* مثبت تشخیص داده شدند که نسبت به تحقیق ما و سایر تحقیقات از فراوانی کمتری برخوردار می‌باشند (۳۹).

در مطالعه انجام شده توسط فرشاد و همکاران در سال ۱۳۸۷ سویه‌های *اشریشیا کلی* از نمونه ادرار کودکان مبتلا به عفونت‌های ادراری مراجعه کننده به بیمارستان جهرم از نظر وجود ژن‌های *hly*،*cnf-1*، *pap*و*sfa* با روش PCR ارزیابی شدند. در مجموع ۹۶ سویه *اشریشیا کلی* از نمونه‌های ادرار ۱۰۱ کودک ۱ ماهه تا ۱۴ ساله، جدا شد. درصد شیوع ژن‌های *pap*،*sfa*،*hly* و*cnf-1* به ترتیب در میان سویه‌ها ۲۷/۱٪، ۱۴/۶٪، ۱۳/۵٪، ۲۲/۹٪ گزارش گردید. شایع‌ترین ژن‌ها در گروه سنی بالای ۳۶ ماه ژن‌های *pap* و*sfa* بودند اما در سنین زیر ۴۸ ماه *hly* شیوع

بیشتری داشت. در این تحقیق نیز نسبت به سایر تحقیقات انجام‌شده ژن‌های *pap* و *sfa* از فراوانی کمتری دارند (۴۰).در مطالعه‌ای که توسط Blanco و همکارانش در اسپانیا انجام شد در مجموع ۲۴۳ سویه *اشریشیا کلی*جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری برای حضور *pap*، *sfa* و*afa* با استفاده از PCR بررسی شد. فراوانی ژن‌های *pap*، *sfa* و *afa* به‌ترتیب ۵۴٪، ۵۳٪، ۲٪ گزارش گردید. در این تحقیق نیز ژن *pap* از فراوانی بالاتری نسبت به ژن‌های *afa* و *sfa* برخوردار می‌باشد(۴۱). در مطالعه‌ای که توسط Arisoy و همکاران در سال ۲۰۰۶ در ترکیه انجام شد، از ۱۶۱ جدایه *اشریشیا کلی* جداشده از عفونت‌های ادراری در کودکان، میزان شیوع ژن‌های *pap*، *sfa*،*afa*، *hly*، *cnf* و*aer* به ترتیب ۳۹/۷۵، ۹/۹۴، ۱/۲۴، ۹/۹۴، ۶/۲۱ و ۲۲/۹۸٪ گزارش شده است (۴۲). در این تحقیق نیز کمترین فراوانی مربوط به *afa* می‌باشد. در مطالعه دیگری که توسط Arabi و همکاران (۲۰۱۲) در ایران انجام شد، از ۳۴۳ جدایه *اشریشیا کلی* جدا شده از نمونه‌های کلینیکی میزان شیوع ژن‌های *fimH*،*sfa*،*pap*،*foc* و*afa* به‌ترتیب ۸۷/۷، ۳۲/۹، ۳۰، ۱۶/۶ و۸/۷٪ گزارش شد. در این تحقیق مشابه تحقیق ما بیشترین فراوانی مربوط به ژن *fimH* و کمترین فراوانی مربوط به *afa* می‌باشد(۴۳). در مطالعه Emamghorashi و همکاران (۲۰۱۱) در ایران، از ۹۶ نمونه *اشریشیا کلی* جدا شده از کودکان دارای عفونت ادراری، میزان شیوع ژن‌های *fim1*،*cnf*،*sfa* و*hly* به‌ترتیب ۲۷/۴، ۲۲/۹، ۱۴/۶و ۱۳/۵٪ گزارش گردید (۴۴). در مطالعه‌ای که توسط Santo و همکاران در سال ۲۰۰۶ در برزیل انجام شد، از ۱۰۰ *اشریشیا کلی* جدا شده از نمونه‌های کلینیکی، میزان شیوع ژن‌های *hly*،*pap*،*sfa* و*afa* به‌ترتیب ۹۶، ۳۲، ۱۹ و ۱۱٪ گزارش شده است (۴۵).

نتیجه‌گیری

تشکیل بیوفیلم باعث حفاظت باکتری‌ها در برابر سیستم ایمنی میزبان، مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها هم‌چنین حفظ و نگهداری محیط فیزیکوشیمیایی مناسب برای رشد و بقا، آن‌ها می‌گردد بنابراین آن‌ها قادرند در شرایط نامساعد محیطی مقاومت کرده و به حیات خود ادامه دهند. *اشریشیا کلی* به‌دلیل تولید بیوفیلم به درمان آنتی‌بیوتیکی و دفاع سیستم ایمنی بدن مقاوم است. با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیوفیلم باکتری‌ها نسبت به حالت پلانکتونیک، این مسئله اهمیت بررسی و تشخیص بیوفیلم در عفونت ایجاد شده و لحاظ این مسئله را در درمان نشان می‌دهد. با توجه به مشکلات درمانی بیوفیلم باکتریایی توصیه می‌شود قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک تولید بیوفیلم توسط سویه مورد بررسی مطالعه گردد. نتایج مطالعه حاضر در مقایسه با سایر مطالعه‌های انجام شده در این خصوص، حاکی از حضور قابل توجه ژن‌های *fimH* و *pap* در جدایه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک بیماران دیابتی مبتلا به عفونت‌های دستگاه ادراری بود که بر اهمیت این دو عامل بیماری زا در ایجاد این عفونت مهم بالینی به‌خصوص در بیماران بستری در بخش‌های ویژه بیمارستان‌ها تأکید دارد. این دو عامل در جای‌گیری ارگانیسم در مجاری ادراری و قابلیت ایجاد عفونت و پیشرفت بیماری به اندام‌های فوقانی دستگاه ادراری به‌ویژه در بیماران دیابتی دخیل هستند و توجه به آن‌ها در بحث پیشگیری و درمان بیماران ضروری است.

منابع و مآخذ

1. A1-Kobaisi MF. Jawetz, Melnick & Adelbergs Medical Microbiology. Sultan QaboosUniv Med J. 2007; 273-275.
2. Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic outline of the prokaryots. Bergeys manual of systematic bacteriology. New York: Heidelberg; 2004. 576-582.
3. Agarwal J, Srivastava S, Singh M. Pathogenomics of uropathogenic Escherichia coli. Indian J Med Microbiol. 2012; 30(2):141-149.
4. Lim JK, Gunther NW , Zhao H, Johnson DE, Keay SK, Mobley HL. In vivo phase variation of Escherichia coli type 1 fimbrial genes in women with urinary tract infection. Infect Immun. 1998; 66(7):3303-3310.
5. Lüthje P, Brauner A.Virulence factors of uropathogenic E. coli and their interaction with the host. Adv Microb Physiol. 2014; 65(4):337-372.
6. Antao EM, Wieler LH, Ewers C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic Escherichia coli. Gut Pathog. 2009; 1(1): 22.
7. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of Escherichia coli strains from patientswith urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J Infect Dis. 2000; 181(1): 261–272.
8. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic Escherichia coli. Nat Rev Microbiol 2004; 2(2): 123-140.
9. Dhakal BK, Kulesus RR, Mulvey MA. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic Escherichia coli. Eur J Clin Invest.2008; 38 (S2): 2-11.
10. 10.Abraham SN, Sun D, Dale JB, Beachey EH. Conservation of the D-mannose-adhesion protein among type 1 fimbriated members of the family Enterobacteriacaea. Nature.1988; 336(15): 682-684.
11. Langermann S, Ballou WR. Vaccination utilizing the Fim CH. Complex as a strategy to prevent Escherichia coli urinary tract infections. J Infect Dis. 2001; 183(1):84-86.
12. 12.Boyko EJ, Fihn SD, Scholes D, Abraham L, Monsey B. Risk of urinary tract infection and asymptomaticbacteruria among diabetes and nondiabetic postmenopausal women. Am J Epidemiol. 2005; 161(6): 557-564.
13. Stapleton A. Urinary tract infection in patients with diabetes. Am J Med. 2002; 8 (113): 80S-84S.
14. Hosking DJ, Bennet T, Hampton JR. Diabetic autonomic neuropathy. Diabetes. 1978; 27(10): 1043-1055.
15. Ronald A, Ludwig E. Urinary tract infection in adults with diabetes. Int J Antimicrob Agents. 2001; 17(4): 287-92.
16. Schaeffer AJ. Potential role of phase variation of type I pilli in urinary tract infection and bacterial prostatitis. J Infect Dis. 2005; 3 (8):144-149.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for disk antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5. Wayne, Pa: 2003.
18. Dadawala AL, Chauhan HC, Chandel BS, Ranaware P, Sandip S, Khushbo S, Rathod PH, Shah NM, Kher HN. Assessment of Escherichia coli isolates for Invitro biofilm production. World J Vet. 2010; 3(8): 364-366.
19. Naves P, Delprado G, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, Blanco J, Rodríguez Cerrato V, Ponte MC, Soriano F. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of Escherichia coli is method-dependent. Appl Microbiol. 2008; 105(2):585-590.
20. Dormanesh B, Safarpoor Dehkordi F, Hosseini S, Momtaz H, Mirnejad R, Hoseini MJ, Yahaghi E,

Tarhriz V, Khodaverdi DE. Virulence factors and O Serogroups profiles of uropathogenic Escherichia coli Isolated from Iranian Pediatric Patients. Iran Red Crescent Med J. 2014; 16(2): 14627-14634.

21. Karimian A, Momtaz H, Madani M. Detection of uropathogenic Escherichia coli virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. Afr J Microbiol Res. 2012; 6(39): 6811-6.

22. Kudinha T, Kong F, Johnson JR, Andrew SD, Anderson P, Gilbert GL. Multiplex PCR-based reverse line blot assay for simultaneous detection of22 virulence genes in uropathogenic Escherichia coli. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(4): 1198–202.

23. Santo E, Macedo C, Marin JM. Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli from auniversity hospital in Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2006; 48(4):185-188.

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. Infect Dis. 2013; 17(6): 450-453.

25. Behrooozi A, Rahbar M, Yousefi J. A surveyor Epidemiology of urinary tract infections andresistance pattern of uropathogenes in an Iranian 1000-bed tertiary care hospital. Afr J Microbiol Res. 2010; 4(9): 735-756.

26. Assob NJC, Weledji EP, Njunda AL, BolimoF, Asongalem EA, Kamga FHL, et al .Bacteriological and mycological characterization of some pathogens of the urogenital tract in Bueasubdivision (South West Region Cameroon) .Health Sci Dis. 2009; 10(3): 10–16.

27. Akoachere JF, Yvonne S, Akum NH, Seraphine EN. Etiologic profile and antimicrobial susceptibility of community acquired urinary tract infection in two Cameronian towns. BMC Res Notes. 2012; 5(1): 219.

28. Jadhav S, Hussain A, Devi S, Kumar A, Parveen S, Gandham N, et al. Virulence characteristics and genetic affinities of multipledrug resistant uropathogenic Escherichia coli froma semi urban locality in India. PLoS One. 2011 ;6(3): e18063.

29. Brumbaugh AR, Mobley HL. Preventingurinary tract infection: progress toward an effective Escherichia coli vaccine. Expert Rev Vaccines. 2012; 11(6): 663–676.

30. 30.Hoepelman AI, Meiland R, Greelings SE. Pathogenesis and management of bacterial urinary tract infections inadult patients with diabetes mellitus. Int J Antimicrob Agents. 2003; 22(2): 35-43 .

31. shay A, Lavi I, Luboshitzky R. Prevalence and risk factor for asymptomatic bacteriuria in women with Type 2diabetes mellitus. Diabet Med. 2006; 23(2): 185-188.

32. 32.Boroumand MA, Sam L, Abbasi SH, Salarifar M, Kassaian E, Forghani S. Asmptomaticbacteriuria in type 2 Iranian diabetic women: a cross sectional study. BMC. Women's Health. 2006; 6:4.

۳۳.محمدی‌مهر، م. عبدی‌عالی، الف. (۱۳۸۳). مطالعه تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزا با روش اصلاح شده پلیت میکروتیتر و میکروسکوپ الکترونی نگاره. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، ۲(۱):۲۹۵-۲۹۹.

۳۴.ارباب سلیمانی، ن. امینی، ز. تاج بخش، الف. (۱۳۹۲). بررسی عامل اتصال و تشکیل بیوفیلم در اشریشیا کلی یوروپاتوژن جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در استان سمنان. مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۶(۹۶):۳۳۲-۳۳۶.

35. Ponnusamy PNV. Invitro biofilm formation by uropathogenic Escherichia coli and their antimicrobial susceptibility pattern. Asian Pac J Trop Med. 2012; 5(3):210-213.

36. 36.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 Immunol Med Microbiol. 1995; 12 (2): 85-90.

37. Emamghorashi F, Farshad S, Kalani M. (2011). Relationship between O Serotype and Virulent genes in Escherichia coli causing urinary tract infections. Iran J Kidney Dis. 5: 234-237.

38. Ponnusamy P, Natarajan V, Sevanan M. Invitro biofilm formation by uropathogenic Escherichia coli and their antimicrobial susceptibility pattern. Asian PacJ Trop. 2012; 5(3): 210-213.

39. 39.Marhova M, Kostadinova S, Stoitsova S. Biofilm-forming capabilities of urinary Escherichia coli isolates. Biotechnol & Biotechnol EQ. 2009; 24 (2): 589-593.

۴۰.فرشاد ش، امام‌قریشی ف، امین‌شهیدی م. (۱۳۸۷). ارزیابی اپیدمیولوژیک ژن‌های ویرولانس pap،sfa،cnf-1 و hly در سویه‌های اشریشیا کلی جدا شده از کودکان مبتلا به عفونت مجاری ادراری. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران،۳: ۳۱-۳۷.

۴۱.نعمتی، ف. فیروزه، ف. صفاری، م. موسوی، غ. (۱۳۹۳). بررسی فراوانی اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک مولد عفونت ادراری و تعیین برخی ژن‌های ویرولانس در جدایه‌های جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان شهید بهشتی کاشان طی سال‌های ۹۲-۱۳۹۱. ماه‌نامه علمی-پژوهشی فیض، ۱۸(۳): ۲۸۰-۲۸۶.

۴۲.استادمحمدی، س. شیرازی، م. فلاح مهرآبادی، ج. پورمند، م. حمیدیه، ف. ملاآقامیرزایی، ه. افشار د. (۱۳۹۲). کلونینگ ژن fimH اشریشیا کلی یوروپاتوژن و بررسی تنوع توالی آن. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر، ۱۶(۳): ۱۹۷-۱۸۹.

۴۳.شجاعیان، ع. نوروزی، ج. پاکزاد، پ. (۱۳۹۲). فراوانی ژن fimH در اشریشیا کلی‌های جدا شده از مبتلایان به عفونت ادراری با و بدون سنگ کلیه. فصلنامه بیماری‌های عفونی و گرمسیری وابسته به انجمن متخصصین بیماری‌های عفونی و گرمسیری، ۳۳: ۳۸-۶۱.

44. Usein CR, Damian M, Tatu- chitaiu D, Capusa C, Faqaras R, Tudorache D. Prevalence of virulence genes in E. coli strains isolated from Romanian adult UTI cases. Molecular epidemiology laboratory, cantracuzinoinstitiute. Bucharest, Romanian. J Cell Mol Med. 2001; 5(3): 303-310.

45. Rijavec M, Muller Premru M, Zakotnik B, Zgur Bertok D. Virulence factors and biofilm production among Escherichia coli strains causing bacteraemia of urinary tract origins. Med Microbiol. 2008; 57 (3): 1329-1334.