فراوانی و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم ESBL مثبت جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در تهران در سال ۱۴۰۱

فاتح رحیمی[1*]، ساناز خاشعی[2]

۱- دکتری تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۲- دانشجوی دکتری تخصصی باکتری شناسی، گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
*نشانی برای مکاتبه: f.rahimi@sci.ui.ac.ir

دریافت مقاله: دی ۱۴۰۲ پذیرش برای چاپ: بهار ۱۴۰۳

چکیده

سابقه و هدف: *سویه های اشرشیا کلای اروپاتوژنیک از جمله عوامل اصلی ایجاد عفونتهای دستگاه ادراری در سراسر جهان محسوب می شوند. آنها می توانند مجرای ادرار را کلونیزه کرده و بیوفیلم تشکیل دهند که به باکتریها امکان بقاء و دوام در شرایط نامساعد محیط را می دهد که منجر به عود عفونت و در نهایت مرگ بیمار می شود. مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم و آنزیمهای بتا-لاکتاماز وسیع الطیف جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در شهر تهران در سال ۱۴۰۱ انجام گرفت.*

روش کار: *در مجموع ۱۴۱ ایزوله مشکوک به اشرشیا کلای از بیماران مبتلا به عفونت ادراری از آزمایشگاه یک بیمارستان مرجع در شهر تهران جمع آوری گردید و با استفاده از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن tufA مورد شناسایی قرار گرفتند. توانایی تولید بیوفیلم در میان سویه های تأیید شده با استفاده از آزمونهای کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت مورد ارزیابی قرار گرفت. مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های مولد بیوفیلم نسبت به ۱۷ آنتی بیوتیک و توانایی تولید آنزیمهای بتا-لاکتاماز وسیع الطیف به روش انتشار دیسک و بر اساس دستورالعملهای CLSI تعیین گردید.*

یافته ها: *با استفاده از آزمون PCR، ۱۲۷ سویه (۹۰ درصد) به عنوان اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک مورد تأیید قرار گرفتند و در مجموع ۷۹ سویه (۶۲ درصد) بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو قادر به تشکیل به کورلای و سلولز بودند که به عنوان سویه های بیوفیلم مثبت انتخاب شدند که در این میان ۱۶، ۷۴ و ۱۰ درصد به ترتیب واجد مورفوتایپ rdar، bdar و pdar بودند. همچنین، ۶۱ و ۳۰ درصد سویه ها مولد بیوفیلم قوی و متوسط بودند. از طرف دیگر، مقاومت بالایی در میان سویه ها نسبت به آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفپودوکسیم، سفتریاکسون و سولفامتوکسازول-تری متوپریم مشاهده شد. همچنین، ۶۸ درصد سویه های بیوفیلم مثبت به عنوان مولد آنزیمهای بتا-لاکتاماز وسیع الطیف تعیین شدند و مقاومت آنتی بیوتیکی در میان سویه های ESBL مثبت در تمامی موارد به استثناء ایمی پنم، مروپنم، سفوکسی تین، پیپراسیلین-تازو باکتام و آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید بالاتر از سویه های ESBL منفی بود.*

نتیجه گیری: *نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده فراوانی بالای سویه های اشرشیا کلای مولد بیوفیلم و آنزیمهای بتا-لاکتاماز وسیع الطیف در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری در تهران است که از مقاومت آنتی بیوتیکی بالایی نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیکها برخوردار می باشند که مؤید نیاز به استفاده از روشهای اختصاصی و سریع جهت شناسایی این سویه ها می باشد.*

کلمات کلیدی: عفونت ادراری، اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک، بیوفیلم، بتالاکتاماز وسیع الطیف

مقدمه

عفونتهای دستگاه ادراری از جمله شایعترین و مهمترین عفونتهای باکتریایی در انسان شناخته می شوند که به عنوان یک معضل بهداشتی مهم در سطح جهانی به شمار می روند و باعث تحمیل هزینه های درمانی بالا به نظام سلامت و افرد

بیمار می شود. در سال ۲۰۱۹ در مجموع چهارصد و چهار میلیون و ششصد و ده میلیون مورد ابتلا به عفونت ادراری در سراسر جهان گزارش گردید که در این میان ۲۳۶۷۹۰ مورد مرگ و میر ناشی از ابتلا به این عفونت و عوارض ناشی آن ثبت شده است (۱). علاوه بر این، عفونتهای ادراری می توانند منجر به عواقب شدید متعدد، از جمله عود عفونت، پیلونفریت[۱] همراه با سپسیس[۲]، اسکار کلیه و حتی زایمان زودرس شود (۲). *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک[۳] مهمترین عامل ایجاد عفونت ادراری در جهان و به ویژه در خانمها به شمار می رود که منجر به ایجاد ۹۰-۸۰ درصد عفونتهای اکتسابی از جامعه و ۵۰-۳۰ درصد عفونتهای اکتسابی از بیمارستان می شود (۱, ۳).

سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک قادر به تشکیل جوامع باکتریایی درون سلولی[۴] در اپیتلیوم مثانه هستند که با عنوان بیوفیلم شناخته می شوند (۴). تشکیل بیوفیلم توسط سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک سبب افزایش مقاومت این باکتری نسبت به درمانهای ضد میکروبی و پاسخهای ایمنی میزبان می گردد (۵). تحقیقات نشان داده اند که حداقل غلظت مهارکننده آنتی بیوتیکها در مقابل باکتریها در حالت بیوفیلم ممکن است ۱۰۰۰۰-۱۰ برابر بیشتر از غلظت مورد نیاز برای باکتریها در حالت پلانکتونیک باشد (۸). علاوه بر این، نزدیکی سلولها در یک جامعه بیوفیلمی می تواند باعث تسهیل انتقال افقی ژنهای رمزکننده مقاومت آنتی بیوتیکی و در نتیجه گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی و افزایش حدت باکتریها شود (۱). بنابراین، تولید بیوفیلم به عنوان یکی از مهمترین عوامل بیماریزایی در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک شناخته می شود که همین امر این باکتری را به یک معضل بهداشتی و نگرانی عمده در جهان تبدیل کرده است (۳).

در سالهای اخیر استفاده بی رویه از آنتی بیوتیکهای مرسوم در درمان عفونتهای ادراری به دلیل، انجام درمانهای تجربی و بدون تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های باکتریایی، مصرف خودسرانه و بدون نسخه پزشک آنتی بیوتیکها، مواجهه مداوم افراد با غذاها و محصولات کشاورزی و دامی واجد آنتی بیوتیکها (عمدتا به عنوان محرکهای رشد) و همچنین مصرف آب آشامیدنی ناسالم و تصفیه نشده، سبب گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی در جامعه و ایجاد سویه های باکتریایی واجد فنوتایپ[۵] مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه[۶] گشته است که این عامل خود منجر به افزایش احتمال شکست پروتکلهای درمانی رایج و مرگ و میر بیماران می شود (۶).

طیف اثر گسترده و سمّیت انتخابی آنتی بیوتیکهای خانواده بتا-لاکتام، باعث شده تا این خانواده آنتی بیوتیکی و به ویژه سفالوسپورینها، جایگاه ویژه ای در درمان عفونتهای باکتریایی از جمله عفونتهای ادراری داشته باشند. مقاومت سویه های باکتریایی نسبت به اعضای این خانواده معمولا از طریق تولید آنزیمهای غیرفعال کننده آنتی بیوتیک، مانند آنزیمهای بتا-لاکتاماز، صورت می گیرد. آنزیمهای بتا-لاکتاماز از نظر ژنتیکی و ساختاری ارتباط نزدیکی با پروتئینهای متصل شونده به پنی سیلین دارند و تولید آنها توسط باکتریها به عنوان سازوکار اصلی مقاومت در برابر فعالیت آنتی بیوتیکهای بتا-لاکتام محسوب می شود (۷). آنزیمهای بتا-لاکتاماز وسیع الطیف[۷] قادر به هیدرولیز سفالوسپورینهای وسیع الطیف (نسل ۳ و ۴)، از جمله سفوتاکسیم، سفتریاکسون و سفتازیدیم، هستند و همچنین توسط اسید کلاوولانیک[۸] و تازوباکتام[۹] مهار می شوند؛ اما با این وجود، این آنزیمها هیچگونه تأثیری بر سفامایسینها[۱۰] و کارباپنمها[۱۱] ندارند (۸). در حال حاضر، شیوع بالای عفونتهای ادراری اکتسابی از جامعه توسط سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مولد آنزیمهای بتا-لاکتاماز وسیع الطیف و مقاومت این سویه ها به کلاسهای مختلف آنتی بیوتیکهای بتا-لاکتامی، منجر به بروز مشکلات درمانی عدیده ای شده است (۹). بر اساس ارزیابی اپیدمیولوژی مولکولی، شناسایی سویه های *اشرشیا کلای* مولد بتا-لاکتاماز وسیع الطیف و واجد مقاومت چندگانه، می تواند کمک مؤثری در جهت کاهش مرگ و میر بیماران و مهار شیوع سویه های مقاوم از طریق انتخاب داروهای مناسب و اتخاذ روشهای کنترل عفونت موثر باشد (۴). لذا این مطالعه با هدف تعیین فراوانی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت مولد آنزیمهای بتا-لاکتاماز وسیع الطیف جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در یک بیمارستان مرجع در شهر تهران در سال ۱۴۰۱ به انجام رسیده است.

مواد و روش‌ها

---

[۱] Pyelonephritis
[۲] Sepsis
[۳] Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)
[۴] Intracellular bacterial communities (IBCs)
[۵] Phenotype
[۶] Multidrug resistance (MDR)
[۷] Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)
[۸] Clavulanic acid
[۹] Tazobactam
[۱۰] Cephamycins
[۱۱] Carbapenems

جمع آوری و شناسایی جدایه های *اشرشیا کلای*

در این مطالعه در بازه زمانی اردیبهشت لغایت آبان ۱۴۰۱ در مجموع ۱۴۱ ایزوله مشکوک به *اشرشیا کلای* جداسازی شده از بیماران بستری مبتلا به عفونت ادراری از آزمایشگاه یک بیمارستان مرجع در شهر تهران، جمع آوری گردید. لازم به ذکر است که تمامی مراحل نمونه گیری توسط آزمایشگاه بیمارستان انجام گرفت و نمونه ها پس از جمع آوری کشت داده شده و پس از شناسایی اولیه در آزمایشگاه بیمارستان، جهت انجام این تحقیق به صورت هفتگی جمع آوری و با حفظ و رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه اصفهان منتقل شدند. تمامی بیماران واجد علائمی مانند سوزش به هنگام دفع، تکرر ادرار، کدورت و تغییر رنگ ادرار، بعضا هماچوری، درد در طرفین شکم، تب و گاها لرز بودند که جهت بررسی به آزمایشگاه بیمارستان ارجاع شده بودند. همچنین، ۸۳ ایزوله (۵۹ درصد) متعلق به نمونه های ادراری خانمها و ۵۸ ایزوله (۴۱ درصد) نیز مربوط به نمونه های آقایان بودند. ایزوله ها پس از انتقال به آزمایشگاه در ابتدا بر روی محیطهای کشت ژلوز مک کانکی (Merck, Germany) و ژلوز ائوزین متیلن بلو (Merck, Germany) کشت داده شدند و در نهایت ایزوله های مشکوک به *اشرشیا کلای* انتخاب و شناسایی و تأیید نهایی با آزمون PCR و با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *tufA* صورت گرفت (۴).

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم به روش کیفی

جهت غربالگری اولیه سویه های مولد بیوفیلم در میان سویه های تأیید شده *اشرشیا کلای* جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در این مطالعه، از آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو استفاده شد. در این روش، باکتری ها بر روی محیط کنگو-رد آگار کشت داده شده و ابتدا به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷°C و سپس به مدت یک شب در دمای اتاق انکوبه شدند. در نهایت سویه‌های واجد کلنی‌های سیاه، قرمز تیره و قرمز روشن، به ترتیب به‌عنوان بیوفیلم مثبت (تشکیل بیوفیلم قوی)، کلنی‌های مشکوک (تشکیل بیوفیلم متوسط) و بیوفیلم منفی، تفسیر طبقه بندی شدند (۳).

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم به روش کمی

از روش میکروتیتر پلیت برای تشخیص تولید بیوفیلم به روش کمی، استفاده شد. ابتدا سویه های باکتریایی در محیط تریپتون سویا براث[۱۲] حاوی گلوکز (۰.۲۵٪)، به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷°C رشد داده شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی (غلظت نهایی ~ 10^6 CFU/ml) به هر یک از چاهکهای میکروتیتر پلیت، اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷°C، مایع رویی تخلیه و پلیت سه مرتبه با بافر فسفات نمکی[۱۳] (PBS)، شستشو داده شد.ئسلول های چسبیده به کف چاهک با استفاده از کریستال ویوله (۰.۳٪) به مدت ۱۰-۵ دقیقه رنگ آمیزی و سپس از آب استریل برای شستشوی رنگ غیر پیوندی استفاده شد. در نهایت، بیوفیلم های رنگ آمیزی شده توسط محلول اتانول: استون (۸۰:۲۰) حل شدند و جذب نوری توسط ELISA reader (Stat fax-2100) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. سپس، توانایی تشکیل بیوفیلم هر سویه به شرح زیر طبقه بندی شد: $OD_{570} \geq 1$ -تولید کننده بیوفیلم قوی، $0.2 \leq$ < $1OD_{570}$-تولید کننده بیوفیلم متوسط، $0.2 > OD_{570}$ - تولید کننده بیوفیلم ضعیف. تمامی آزمایش ها در سه تکرار انجام شد و چاهک های فاقد سلول های باکتریایی به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شدند (۳).

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی

در این مطالعه جهت تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم نسبت به ۱۹ آنتی بیوتیک از آزمون انتشار دیسک بر اساس دستورالعمل CLSI استفاده گردید (۱۰). آنتی بیوتیکهای مورد بررسی شامل آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم)، آموکسی سیلین/کلاوولانیک اسید (۱۰/۳۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، افلوکساسین (۵ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، پیپراسیلین/تازوباکتام (۱۰/۱۰۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سفپودوکسیم (۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم-کلاوولانات (۱۰/۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم-کلاوولانات (۱۰/۳۰ میکروگرم)، سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم)، سولفامتوکسازول-تری متوپریم (۱۰/۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، کانامایسین (۳۰ میکروگرم)، لووفلوکساسین (۵ میکروگرم) و مروپنم (۱۰ میکروگرم) (Liofilchem, Italy) بودند.

[۱۲] Tryptic soy broth
[۱۳] Phosphate Buffered saline

استخراج DNA و آزمون PCR

برای استخراج DNA از روش جوشاندن بر اساس دستورالعمل قاسمی و همکاران استفاده گردید (۴). بر این اساس، یک کلنی تک از کشت تازه و خالص هر ایزوله باکتریایی در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل و به خوبی ورتکس گردید و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه ترموبلاک (پدیده نوژن پارس) جوشانده شد و در نهایت پس از سانتریفیوژ (ارمغان طب ایرانیان) در g × ۱۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه، از مایع رویی به عنوان DNA الگو در آزمون PCR استفاده گردید. همچنین، جهت شناسایی نهایی و تأیید ایزوله های واجد کلنیهای صورتی رنگ بر روی محیط ژلوز مک کانکی و کلنیهای ارغوانی با جلای سبز متالیک بر روی محیط ژلوز ائوزین متیلن بلو، آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *tuf*A بر اساس مخلوط واکنش و برنامه حرارتی ارائه شده توسط قاسمی و همکاران مورد استفاده قرار گرفت (۴). توالی پرایمرها مشتمل بر *tuf*A F: 5′- TGGTTGATGACGAAGAGCTG-3′ و *tuf*A R: 5′-GCTCTGGTTCCGGAATGTAA-3′ بود و طول قطعه مورد انتظار نیز ۲۰۰ جفت باز بود.

تجزیه و تحلیل داده های آماری

جهت رسم تمامی نمودارها و بررسی و تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار GraphPad Prism 5 و آزمون Chi-squared استفاده گردید.

نتایج

شناسایی سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم

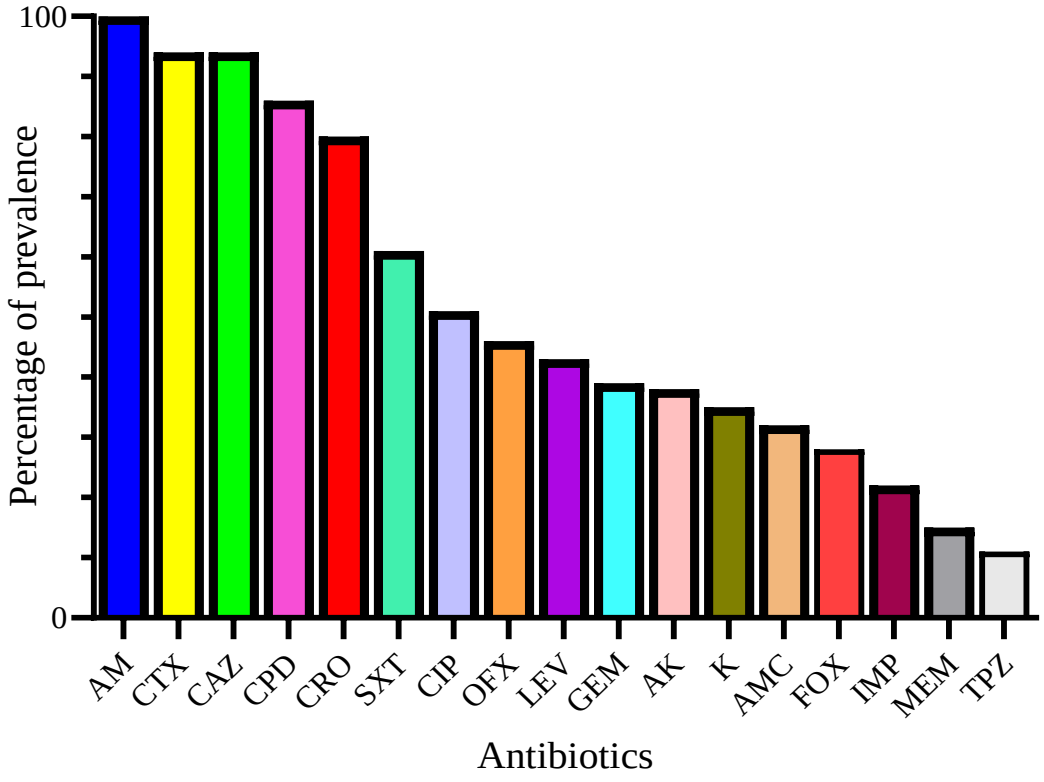
در این مطالعه از مجموع ۱۴۱ ایزوله جمع آوری شده در نهایت ۱۲۷ سویه (۹۰ درصد) بر روی محیطهای کشت ژلوز مک کانکی و ژلوز ائوزین متیلن بلو به ترتیب واجد کلنیهای صورتی و کلنیهای ارغوانی با جلای فلزی سبز متالیک بودند و همچنین در آزمون PCR نیز واجد باند اختصاصی مربوط به ژن *tuf*A بودند که به عنوان سویه های *اشرشیا کلای* مورد تأیید قرار گرفتند. در آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو، ۴۸ سویه (۳۸ درصد) کورلای[۱۴] و سلولز منفی بودند (کلنیهای saw) و به عنوان سویه های بیوفیلم منفی انتخاب شدند. همچنین، ۱۳ سویه (۱۶ درصد) واجد کلنیهای rdar (کورلای و سلولز مثبت)، ۵۸ سویه (۷۴ درصد) واجد کلنیهای bdar (کورلای مثبت و سلولز منفی) و ۸ سویه (۱۰ درصد) نیز واجد کلنیهای pdar (کورلای منفی و سلولز مثبت) بودند. از طرف دیگر، بر اساس نتایج حاصل از آزمون کمی میکروتیتر پلیت مشخص گردید از مجموع ۷۹ سویه *اشرشیا کلای* بیوفیلم مثبت در آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو، ۴۸ سویه (۶۱ درصد) مولد بیوفیلم قوی، ۲۴ سویه (۳۰ درصد) مولد بیوفیلم متوسط و ۷ سویه (۹ درصد) مولد بیوفیلم ضعیف بودند.

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی

بر اساس نتایج حاصل از آزمون انتشار دیسک جهت تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم مشخص شد که تمامی ۷۹ سویه (۱۰۰ درصد) نسبت به آمپی سیلین مقاوم بودند و همچنین ۹۴، ۹۴، ۸۶ و ۸۰ درصد سویه ها به ترتیب نسبت به سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفپودوکسیم و سفتریاکسون مقاومت نشان دادند (شکل ۱). از طرف دیگر، ۸۹، ۸۵، ۷۸، ۷۲، ۶۸، ۶۵، ۶۲ و ۶۱ درصد سویه ها نیز به ترتیب نسبت به پیپراسیلین-تازوباکتام، مروپنم، ایمی پنم، سفوکسی تین، آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید، کانامایسین، آمیکاسین و جنتامایسین حساسیت نشان دادند. علاوه بر این، در بحث مقاومت نسبت به فلوروکینولونها نیز به ترتیب ۵۱، ۴۶ و ۴۳ درصد سویه ها نسبت به سیپروفلوکساسین، افلوکساسین و لووفلوکساسین مقاوم بودند.

در این مطالعه در مجموع ۶۷ سویه (۸۴ درصد) *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم نسبت به سه آنتی بیوتیک سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفپودوکسیم مقاوم بودند. همچنین، ۲۲ سویه (۲۸ درصد) نیز نسبت به سفوکسی تین مقاومت نشان دادند. علاوه بر این، ۵۴ سویه (۶۸ درصد) در آزمون انتشار دیسکهای سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید و سفتازیدیم-کلاولانیک اسید واجد قطر هاله عدم رشد بیش از ۵ میلیمتر در مقایسه با دیسکهای سفوتاکسیم و سفتازیدیم به تنهایی بودند و به عنوان سویه های مولد آنزیم ESBL مورد شناسایی قرار گرفتند.

[۱۴] Curli



شکل ۱- درصد مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم. اختصارات عبارتند از: AM: آمپی سیلین، CTX: سفوتاکسیم، CAZ: سفتازیدیم، CPD: سفپودوکسیم، CRO: سفتریاکسون، SXT: سولفامتوکسازول-تری متوپریم، CIP: سیپروفلوکساسین، OFX: افلوکساسین، LEV: لووفلوکساسین، GEM: جنتامایسین، AK: آمیکاسین، K: کانامایسین، AMC: آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید، FOX: سفوکسی تین، IMP: ایمی پنم، MEM: مروپنم، TPZ: پیپراسیلین-تازوباکتام.

بر اساس نتایج حاصل از بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم ESBL مثبت و منفی مشخص شد که تمامی سویه های مولد ESBL نسبت به آنتی بیوتیکهای ایمی پنم، مروپنم، سفوکسی تین، آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید و پیپراسیلین-تازوباکتام حساس بودند (جدول ۱). همچنین، مقاومت نسبت به سایر آنتی بیوتیکهای مورد مطالعه به استثناء آمپی سیلین، سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، لووفلوکساسین و کانامایسین در میان سویه های ESBL مثبت به شکل معنی داری بیشتر از سویه های ESBL منفی بود. بر اساس نتایج حاصل از بررسی فراوانی سویه های مولد ESBL در میان سویه های مولد بیوفیلم مشخص شد که از مجموع ۵۴ سویه مولد آنزیمهای بتا-لاکتاماز وسیع الطیف، ۱۳ سویه (۲۴ درصد) واجد مورفوتایپ[۱۵] rdar و ۴۱ سویه (۷۶ درصد) نیز واجد مورفوتایپ bdar بودند و هیچکدام از سویه های واجد مورفوتایپ pdar قادر به تولید ESBL نبودند. علاوه بر این، فراوانی سویه های بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف در میان سویه های *اشرشیا کلای* با توانایی تولید ESBL به ترتیب محدود به ۳۲ (۵۹ درصد)، ۱۸ (۳۳ درصد) و ۴ (۸ درصد) سویه ها بود. از طرف دیگر، ۳۳ سویه (۶۱ درصد) نیز به عنوان سویه های مولد ESBL با مقاومت چندگانه تعیین شدند که واجد مقاومت نسبت به حداقل سه خانواده مختلف آنتی بیوتیکی بودند.

[۱۵] Morphotype

جدول ۱- فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی در میان سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم ESBL مثبت و منفی.

آنتی بیوتیک	ESBL (درصد)	Non-ESBL (درصد)	تعداد (درصد)	*P* value
آمپی سیلین	۵۴ (۱۰۰)	۲۵ (۱۰۰)	۷۹ (۱۰۰)	<۰/۹۹۹۹
سفوتاکسیم	۵۴ (۱۰۰)	۲۰ (۸۰)	۷۴ (۹۴)	**<۰/۰۰۰۱**
سفتازیدیم	۵۴ (۱۰۰)	۲۰ (۸۰)	۷۴ (۹۴)	**<۰/۰۰۰۱**
سفپودوکسیم	۵۴ (۱۰۰)	۱۴ (۵۶)	۶۸ (۸۶)	**<۰/۰۰۰۱**
سفتریاکسون	۴۸ (۸۹)	۱۵ (۶۰)	۶۳ (۸۰)	**<۰/۰۰۰۱**
سولفامتوکسازول-تری متوپریم	۳۷ (۶۸)	۱۱ (۴۴)	۴۸ (۶۱)	**۰/۰۰۱۰**
سیپروفلوکساسین	۲۹ (۵۴)	۱۱ (۴۴)	۴۰ (۵۱)	۰/۲۰۲۹
افلوکساسین	۲۷ (۵۰)	۱۰ (۴۰)	۳۶ (۴۶)	۰/۲۰۰۷
لووفلوکساسین	۲۵ (۴۶)	۹ (۳۶)	۳۴ (۴۳)	۰/۱۹۵۶
جنتامایسین	۲۶ (۴۸)	۵ (۲۰)	۳۱ (۳۹)	**<۰/۰۰۰۱**
آمیکاسین	۲۴ (۴۴)	۶ (۲۴)	۳۰ (۳۸)	**۰/۰۰۴۴**
کانامایسین	۲۰ (۳۷)	۸ (۳۲)	۲۸ (۳۵)	۰/۵۵۲۰
آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید	۰	۲۵ (۱۰۰)	۲۵ (۳۲)	**<۰/۰۰۰۱**
سفوکسی تین	۰	۲۲ (۸۸)	۲۲ (۲۸)	**<۰/۰۰۰۱**
ایمی پنم	۰	۱۷ (۶۸)	۱۷ (۲۲)	**<۰/۰۰۰۱**
مروپنم	۰	۱۲ (۴۸)	۱۲ (۱۵)	**<۰/۰۰۰۱**
پیپراسیلین-تازوباکتام	۰	۹ (۳۶)	۹ (۱۱)	**<۰/۰۰۰۱**

بحث

نتایج حاصل از تحقیقات نشان می دهند که ۹۰-۷۰ درصد عفونتهای دستگاه ادراری ناشی از *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بوده (۲۲) که خود به دو دسته عفونتهای تک گیر و عفونتهای عودشونده تقسیم بندی می شوند. عفونتهای عودشونده مرتبط با تشکیل بیوفیلم توسط ایزوله هایی است که به درستی شناسایی و درمان نشده و در نتیجه به مدت طولانی در دستگاه ادراری باقی مانده اند (۴). در باکتری *اشرشیا کلای*، تولید بیوفیلم ناشی از تولید کورلای و سلولز (جداگانه یا به صورت همزمان) و همچنین قرار گرفتن باکتری در یک ماتریکس پلی ساکاریدی خارج سلولی آب گریز است که باعث دوام و حضور طولانی مدت باکتری در شرایط نامناسب از جمله دستگاه ادراری می شود (۳, ۱۱). سویه های حاضر در این کنسرسیوم[۱۶] تشکیل شده، به دلیل داشتن عوامل مقاومتی مختلف نسبت به آنتی بیوتیکها و بسیاری از عوامل ضدمیکروبی، به عنوان یک مخزن بسیار مهم عناصر ژنتیکی مقاومت محسوب می شوند که می توانند با انتشار و انتقال مقاومت به سایر سویه های کامنسال[۱۷] و بیماریزا، منجر به گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی شوند (۴, ۱۱). بنابراین استفاده از روشهای کارآمد و سریع جهت تعیین توانایی سویه های باکتریایی در تشکیل بیوفیلم می تواند به انتخاب راهکارهای درمانی مناسب جهت ریشه کنی و ممانعت از ظهور سویه های مقاوم و در نتیجه عود عفونت کمک شایانی نماید.

در مطالعه حاضر از مجموع ۱۲۷ سویه *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مورد بررسی ۷۹ سویه (۶۲ درصد) قادر به تولید همزمان یا جداگانه کورلای و سلولز بودند که در این میان ۱۶، ۷۴ و ۱۰ درصد سویه ها به ترتیب واجد مورفوتایپهای rdar، bdar و

[۱۶] Consortium

[۱۷] Commensal

pdar بودند. این یافته ها متفاوت با مطالعه قاسمی و همکاران در سال ۲۰۲۳ بود که در آن مطالعه فراوانی مورفوتایپهای rdar، bdar و pdar به ترتیب محدود به ۳۸، ۵۹ و ۳ درصد سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بود (۱۲). به طور کلی در این مطالعه فراوانی سویه های مولد کورلای بالاتر از سویه های مولد سلولز بود که مشابه با سایر مطالعات انجام گرفته در سالهای اخیر در ایران است (۳, ۴, ۱۱-۱۳)، که می تواند مؤید انتشار کلونهای مشابه در شهرهای تهران، اصفهان و زاهدان باشد و همچنین نشان دهنده اهمیت بالاتر کورلای در مقایسه با سلولز در جهت تولید بیوفیلم در سویه های *اشرشیا کلای* است. از طرف دیگر، نتایج حاصل از آزمون کمی میکروتیتر پلیت نشان داد که از مجموع ۷۹ سویه *اشرشیا کلای* بیوفیلم مثبت (۶۲ درصد) در آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو، ۶۱، ۳۰ و ۹ درصد سویه ها به ترتیب قادر به تشکیل بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف بودند. بنابراین، بیشتر سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک در گروه بیوفیلم قوی و متوسط قرار داشتند که نشان دهنده اهمیت تولید بیوفیلم در گسترش بیماریزایی این سویه ها می باشد. این یافته ها در سایر مطالعات نیز مورد تأیید قرار گرفته است (۳, ۴, ۱۱, ۱۲, ۱۴, ۱۵). در مطالعه ای در سال ۲۰۱۵ در آذربایجان شرقی، فراوانی سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم ۹۲ درصد گزارش گردید که بسیار بیشتر از این مطالعه است (۶۲ درصد) (۱۶). در مقابل، در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۶ در ایران، فراوانی سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف به ترتیب محدود به ۱۸/۷۵، ۲۵ و ۵۶/۲۵ درصد سویه ها بود (۱۷). همچنین، در مطالعه ای در مصر نشان داده شد که ۴۴، ۱۰/۸ و ۲۱/۷ درصد ایزوله های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک به ترتیب قادر به تشکیل بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف بودند (۱۸). در مطالعه ای در مکزیک در سال ۲۰۲۳، تمامی ۷۴ سویه *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مورد بررسی بیوفیلم مثبت بودند و فراوانی سویه های مولد بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف نیز به ترتیب ۱۷/۶، ۷۳ و ۹/۴ درصد بود (۱). به طور کلی تفاوت در فراوانی سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم می تواند ناشی از تفاوت در جمعیت مورد بررسی، خصوصا شرایط بالینی بیماران، وضعیت بهداشتی و فرهنگی شهرهای مورد بررسی، زمان نمونه گیری و روشهای مورد استفاده جهت بررسی تشکیل بیوفیلم باشد. در مطالعات قاسمی و همکاران، تمام سویه های با مورفوتایپهای rdar، bdar و pdar در گروه بیوفیلم مثبت و تمامی سویه های با مورفوتایپ saw نیز در گروه بیوفیلم منفی قرار داشتند (۱۱-۱۳) که تا حدودی منطبق بر نتایج مطالعه حاضر است. این یافته ها مؤید ارتباط مستیقم میان تولید کمی بیوفیلم با تولید سلولز و کورلای در روش کیفی ژلوز قرمز کنگو بودند.

توسعه آنتی بیوتیکها کمک شایانی به کاهش مرگ و میر ناشی از عفونت در بیماران کرده است. اما استفاده بی رویه از آنتی بیوتیکها سبب پیدایش و توسعه روز افزون باکتری های مقاوم و در نتیجه نیاز به استفاده از عوامل ضد باکتریایی جدید و مؤثرتر می باشد (۱۹). گسترش رو به رشد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای رایج از جمله خانواده بتا-لاکتام در دهه های گذشته از مخاطرات و چالشهای بسیار مهم در بحث سلامت افراد و کنترل عفونت در سراسر جهان به شمار می رود که منجر به کاهش اثرات درمانی و افزایش قابل توجه هزینه های درمانی می شود (۲۰, ۲۱). مقاومت اکتسابی سویه های *اشرشیا کلای* در برابر آنتی بیوتیکهای بتا-لاکتام عمدتاً ناشی از تولید آنزیمهای بتا-لاکتاماز وسیع الطیف می باشد که منجر به ایجاد مقاومت نسبت به تمامی آنتی بیوتیکهای بتا-لاکتام به استثناء کارباپنمها، سفامایسینها و مهارکننده های بتا-لاکتامازی (از قبیل کلاولانیک اسید، سولباکتام، اوی باکتام و تازوباکتام) می شود (۴, ۹). اولین آنزیمهای ESBL که برای نخستین بار در دهه ۱۹۸۰ معرفی شدند، جهش یافته های آنزیمهای TEM و SHV از دسته آنزیمهای پنی سیلیناز پلاسمیدی بودند که پیشتر در *اشرشیا کلای* و سایر اعضای خانواده *انتروباکتریاسه* مورد شناسایی قرار گرفته بودند (۲۲). علاوه بر این، سویه های مولد بیوفیلم اغلب مقاومت قابل توجهی نسبت به سایر آنتی بیوتیکهای رایج در درمان عفونتهای ادراری از جمله سولفامتوکسازول-تری متوپریم، کینولونها و آمینوگلیکوزیدها نیز نشان می دهند (۴, ۱۲, ۲۲). شناسایی سریع و صحیح سویه های مولد ESBL و تولید آنزیمهای بتا-لاکتاماز وسیع الطیف از نظر تجویز راهکارهای درمان مناسب و کنترل مؤثر عفونت در بیمارستانها از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می باشد. در بیماران مبتلا به عفونتهای ناشی از سویه های مولد ESBL، تأخیر در شروع درمان مناسب و یا اتخاذ راهکارهای درمانی نامناسب منجر به گسترش عفونت از طریق توانایی تشکیل بیوفیلم در سویه های باکتریایی و تبدیل عفونتهای تک گیر به عفونتهای عودشونده خواهد شد (۲۳). علاوه بر این، عفونت با باکتریهای مولد ESBL منجر به طولانی شدن زمان بستری در بیمارستانها، افزایش هزینه های درمان و همچنین بالا رفتن نرخ مرگ و میر بیماران می شود (۲۲). بنابراین، ارزیابی عوامل خطر پیدایش باکتریهای مولد ESBL جهت جلوگیری از بروز چنین مقاومتی بسیار مهم است. باکتریهای مولد ESBL اغلب در بیماران مرتبط با سیستم

مراقبتهای بهداشتی (بستری شدن اخیر در بیمارستان، اقامت طولانی مدت در آسایشگاه ها، جراحیهای اخیر و استفاده از سوندهای ادراری)، استفاده اخیر از عوامل ضد میکروبی (به ویژه نسل سوم و چهارم سفالوسوپورینها و فلوروکینولونها)، بیماران با بیماریهای شدید و بیماران مبتلا به بیماریهای زمینه ای مشاهده می شود (۲۲). در مطالعه ای در سال ۲۰۰۹، پنج عامل خطر جنس مذکر، سن بالاتر از ۶۵ سال، سابقه مصرف آنتی بیوتیک، سابقه بستری شدن در بیمارستان و اقامت در آسایشگاه ها به عنوان عوامل مستعد کننده ابتلا به عفونتهای ناشی از سویه های *اشرشیا کلای* مولد ESBL مطرح شدند (۲۴). تمامی بیماران در آن مطالعه در شش ماه گذشته در بیمارستان بستری شده بودند و ۵ بیمار نیز اخیرا تحت جراحی دستگاه ادراری-تناسلی قرار گرفته بودند. علاوه بر این، تمامی بیماران در سال پیش از مطالعه در معرض استفاده از فلوروکینولونها و سفالوسپورینهای نسل ۳ قرار داشتند.

نتایج حاصل از آزمون تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم نشان داد که به ترتیب ۱۰۰، ۹۴، ۹۴، ۸۶، ۸۰ و ۶۱ درصد سویه ها به ترتیب نسبت به آمپی سیلین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفپودوکسیم، سفتریاکسون و سولفامتوکسازول-تری متوپریم مقاومت نشان دادند. همچنین، ۱۱، ۱۵، ۲۲، ۳۲، ۳۵، ۳۸، ۳۹، ۴۳، ۴۶ و ۵۱ درصد نیز مقاوم به پیپراسیلین-تازوباکتام، مروپنم، ایمی پنم، سفوکسی تین، آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید، کانامایسین، آمیکاسین، جنتامایسین، لووفلوکساسین، افلوکساسین و سیپروفلوکساسین بودند. این یافته ها مشابه سایر مطالعات انجام گرفته است (۱, ۴, ۱۲, ۲۱, ۲۵). مقاومت سطح بالا نسبت به این آنتی بیوتیکها از جمله سولفامتوکسازول-تری متوپریم را می توان با استفاده مکرر از این عامل ضد میکروبی توضیح داد که به عنوان خط اول برای درمان تجربی سیستیت حاد بدون عارضه توصیه می شود (۲۶). همچنین، به دلیل مقاومت آنتی بیوتیکی بالای گزارش شده نسبت به اغلب آنتی بیوتیکهای مورد استفاده در مطالعه حاضر، در انتخاب داروها (مانند سفالوسپورینها) به منظور پیشگیری از عفونتهای ادراری (عمدتاً در عفونتهای بیمارستانی) باید با احتیاط اقدام شود. از طرف دیگر، ۶۸ درصد سویه ها نیز به عنوان سویه های مولد ESBL تعیین شدند که در این میان، ۱۰۰ درصد سویه ها نسبت به آمپی سیلین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفپودوکسیم مقاوم و نسبت به ایمی پنم، مروپنم، سفوکسی تین، آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید و پیپراسیلین-تازوباکتام حساس بودند. در سایر مطالعات انجام گرفته در ایران و سایر نقاط جهان آمار متفاوتی از فراوانی سویه های *اشرشیا کلای* ESBL مثبت گزارش شده است: ایران ۸۹-۲۹ درصد (۴, ۹, ۲۵, ۲۷, ۲۸)، هند ۶۶ درصد (۲۹)، قطر ۸۳ درصد (۳۰). این تنوع در نتایج، ممکن است ناشی از تفاوت در شرایط بیمار از نظر سن، جنس، سرپایی یا بستری بودن و وجود یا عدم وجود بیماری زمینه ای، سیاستهای کنترل عفونت در بیمارستانها، وضعیت فرهنگی، بهداشتی و اقلیمی منطقه جغرافیایی مورد بررسی، زمان نمونه برداری، نوع نمونه های مورد استفاده از نظر وجود یا عدم وجود سوندهای ادراری در بیماران و همچنین دیسکهای آنتی بیوتیکی خارجی یا ایرانی مورد استفاده باشد

در این مطالعه، سویه های مولد بیوفیلم قوی و متوسط از مقاومت آنتی بیوتیکی بالاتر و قدرت تولید ESBL بیشتری نسبت به سویه های مولد بیوفیلم ضعیف برخوردار بودند که این یافته مشابه سایر مطالعات انجام گرفته است (۱, ۴, ۱۲, ۲۱, ۳۱). به طور کلی، تشکیل بیوفیلم منجر به افزایش احتمال انتقال افقی ژنهای مختلف از جمله ژنهای مربوط به آنزیمهای بتا-لاکتاماز در میان سویه ها می شود که این امر ناشی از استحکام بالای ساختار بیوفیلم به واسطه تولید کورلای و سلولز است که محیطی مناسب جهت افزایش قابلیت انتقال عناصر ژنتیکی متحرک را فراهم می کند (۳۲). علیرغم دیدگاه های ارزشمند ارائه شده توسط این مطالعه، محدودیتهای متعددی وجود دارد که ممکن است بر تفسیر نتایج حاصل تأثیر بگذارد. از جمله اینکه مطالعه حاضر بر روی یک منطقه جغرافیایی خاص برای انتخاب بیماران متمرکز شده است. بنابراین، نتایج حاصل ممکن است نشان دهنده شیوع، تنوع، و پروفایلهای حساسیت ضد میکروبی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک در بین بیماران مبتلا به عفوت ادراری در تمام سطح کشور نباشد. همچنین به دلیل عدم همکاری مناسب بیمارستان منتخب در این مطالعه و در نتیجه عدم دسترسی به اطلاعات دموگرافیک بیماران از جمله سن، جنس، و به ویژه سابقه مصرف آنتی بیوتیک توسط آنها، امکان ارائه پروتکلهای متناسب با شرایط هر فرد جهت درمان و جلوگیری از انتشار عفونت وجود نداشت.

نتیجه گیری

تولید بیوفیلم توسط سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک دارای مقاومت آنتی بیوتیکی گسترده و همچنین امکان تولید آنزیمهای بتا-لاکتاماز وسیع الطیف احتمال کلونیزاسیون این سویه ها در اپیتلیوم دستگاه ادراری و در نتیجه گسترش عفونتهای ادراری مقاوم به آنتی بیوتیکهای رایج را افزایش می دهد. بنابراین،

استفاده از روشهای اختصاصی و سریع جهت بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم توسط سویه ها و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها و سنجش تولید آنزیمهای بتا-لاکتاماز وسیع الطیف پیش از تجویز آنتی بیوتیک بسیار ضروری و حائز اهمیت است و می تواند به انتخاب راهکار درمانی مناسب و پیشگیری از عود عفونت کمک شایانی نماید.

تأییدیه اخلاقی

با توجه به اینکه در این مطالعه سویه های باکتریایی از آزمایشگاه بیمارستان جمع آوری شدند و هیچگونه دسترسی به بیماران و اطلاعات شخصی آنان وجود نداشته است، لذا نیازی به اخذ تأییدیه اخلاقی وجود نداشت.

منابع مالی

نویسندگان مقاله هیچگونه کمک مالی و گرنت پژوهشی جهت انجام این تحقیق دریافت نکرده اند.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافعی بین نویسندگان این مقاله وجود ندارد.

REFERENCE

1. Raírez Castillo FY, Guerrero Barrera AL, Harel J, Avelar González FJ, Vogeleer P, Arreola Guerra JM, et al. Biofilm formation by *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections from Aguascalientes, Mexico. Microorganisms. 2023;11(12):2858.
2. Mittal S, Sharma M, Chaudhary U. Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. Pathogens and Global Health. 2015;109(1):26-9.
3. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Genetic diversity and virulence characteristics of biofilm-producing uropathogenic *Escherichia coli*. International Microbiology. 2022;25(2):297-307.
4. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Clonal groups of extended-spectrum β-lactamase and biofilm producing uropathogenic *Escherichia coli* in Iran. Pathogens and Global Health. 2022;116(8):485-97.
5. Rafaque Z, Abid N, Liaqat N, Afridi P, Siddique S, Masood S, et al. In-vitro investigation of antibiotics efficacy against uropathogenic *Escherichia coli* biofilms and antibiotic induced biofilm formation at sub-minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin. Infection and Drug Resistance. 2020;13:2801-10.
6. Abernethy J, Guy R, Sheridan E, Hopkins S, Kiernan M, Wilcox M, et al. Epidemiology of *Escherichia coli* bacteraemia in England: results of an enhanced sentinel surveillance programme. Journal of Hospital Infection. 2017;95(4):365-75.
7. Martin JF, Alvarez-Alvarez R, Liras P. Penicillin-binding proteins, β-lactamases, and β-lactamase inhibitors in β-lactam-producing actinobacteria: self-resistance mechanisms. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(10):5662.
8. Woerther P-L, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β-lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. Clinical Microbiology Reviews. 2013;26(4):744-58.
9. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Characterization of biofilm formation and production of extended spectrum beta lactamase enzymes in *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary infection in Zahedan during 2017. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2022;27(98):29-43.

10. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 31th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2021.
11. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Biofilm formation and frequency of fimbrial genes among *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infection in Zahedan during 2017. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2020;25(91):1-14.
12. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Association between biofilm production and antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary infection in Isfahan during 2017. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2023;28(102):39-51.
13. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Frequency of biofilm producing *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infection in Isfahan, 2017. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2020;25(88):37-47.
14. 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;177(1):365-8.
15. Zamani H, Salehzadeh A. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*: association with adhesion factor genes. Turkish Journal of Medical Sciences. 2018;48(1):162-7.
16. Fattahi S, Kafil HS, Nahai MR, Asgharzadeh M, Nori R, Aghazadeh M. Relationship of biofilm formation and different virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Northwest Iran. GMS Hygiene and Infection Control. 2015;10:1-7.
17. Tajbakhsh E, Ahmadi P, Abedpour-Dehkordi E, Arbab-Soleimani N, Khamesipour F. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic *E. coli* isolated from clinical samples in Iran. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2016;5(11):1-8.
18. Gawad WE, Helmy OM, Tawakkol WM, Hashem AM. 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;11(2):e14444.
19. Alghamdi SAA, Mir SS, Alghamdi FS, Al Banghali MAMMA, Almalki SSR. Evaluation of extended-spectrum beta-lactamase resistance in uropathogenic *Escherichia coli* isolates from urinary tract infection patients in Al-Baha, Saudi Arabia. Microorganisms. 2023;11(12):2820.
20. Haghighifar E, Rezaei AA. Prevalence of ESBLs and biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection in Isfahan, Iran. Infection Epidemiology and Microbiology. 2022;8(3):223-31.
21. Rahimi F, Qasemi A. Frequency of antibiotic resistance and genes encoding integrons among uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infection in Tehran during 2021. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2022;27(98):15-27.
22. Picozzi SC, Casellato S, Rossini M, Paola G, Tejada M, Costa E, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-positive *Escherichia coli* causing complicated upper urinary tract infection: Urologist should act in time. Urology Annals. 2014;6(2):107-12.
23. Zhou Y, Zhang S. Early prediction models for extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* infection in emergency department: A protocol for systematic review and meta analysis. Medicine. 2021;100(15):e25504.
24. Ben-Ami R, Rodríguez-Baño J, Arslan H, Pitout JD, Quentin C, Calbo ES, et al. A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae in nonhospitalized patients. Clinical Infectious Diseases. 2009;49(5):682-90.
25. Hashemizadeh Z, Kalantar-Neyestanaki D, Mansouri S. Clonal relationships, antimicrobial susceptibilities, and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections and fecal samples in Southeast Iran. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2018;51(1):44-51.

26. O'Brien M, Marijam A, Mitrani-Gold FS, Terry L, Taylor-Stokes G, Joshi AV. Unmet needs in uncomplicated urinary tract infection in the United States and Germany: a physician survey. BMC Infectious Diseases. 2023;23(1):281.
27. Shahbazi S, Karam MRA, Habibi M, Talebi A, Bouzari S. Distribution of extended-spectrum β-lactam, quinolone and carbapenem resistance genes, and genetic diversity among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Tehran, Iran. Journal of Global Antimicrobial Resistance. 2018;14:118-25.
28. Naziri Z, Derakhshandeh A, Soltani Borchaloee A, Poormaleknia M, Azimzadeh N. Treatment failure in urinary tract infections: a warning witness for virulent multi-drug resistant ESBL-producing *Escherichia coli*. Infection and Drug Resistance. 2020;13:1839-50.
29. Padmavathy K, Padma K, Rajasekaran S. Extended-spectrum β-lactamase/AmpC-producing uropathogenic *Escherichia coli* from HIV patients: do they have a low virulence score? Journal of Medical Microbiology. 2013;62(3):345-51.
30. Eltai NO, Al Thani AA, Al-Ansari K, Deshmukh AS, Wehedy E, Al-Hadidi SH, et al. Molecular characterization of extended spectrum β-lactamases enterobacteriaceae causing lower urinary tract infection among pediatric population. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2018;7:1-9.
31. Kulkarni S, Peerapur B, Kulkarni A. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains; relationship with virulence factors and antimicrobial resistance. International Journal of Infectious Diseases. 2020;101:137.
32. Uruén C, Chopo-Escuin G, Tommassen J, Mainar-Jaime RC, Arenas J. Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. Antibiotics. 2020;10(1):3.