تعیین ارتباط تشکیل بیوفیلم و تولید آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف در سویه های *اشرشیا کلای* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در زاهدان در سال ۱۳۹۶

علی قاسمی[۱و۲]، فاتح رحیمی[۳*]، محمد کتولی[۴]

۱- دکتری تخصصی میکروبیولوژی، استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان
۲- دکتری تخصصی میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۳- دکتری تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۴- دکتری تخصصی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشکده بهداشت و علوم ورزشی، دانشگاه سان شاین کوست استرالیا
*نشانی برای مکاتبه: f.rahimi@sci.ui.ac.ir

چکیده

سابقه و هدف: *تشکیل بیوفیلم در اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک یک عامل تعیین کننده در ایجاد و گسترش عفونتهای مجرای ادراری به شمار می رود. توانایی تشکیل بیوفیلم و تولید آنزیمهای بتالاکتامازی در اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک، ارتباط قابل توجهی با پایداری و عود عفونتهای ادراری دارد. در این مطالعه فراوانی سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم و بتالاکتاماز جداسازی شده از افراد مبتلا به عفونتهای ادراری در یک بیمارستان مرجع در شهر زاهدان مورد بررسی قرار گرفت.*

روش کار: *در طی سال ۱۳۹۶ در مجموع ۱۱۲ جدایه اشرشیا کلای از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در بیمارستان امام علی (ع) زاهدان جمع آوری گردید و با استفاده از آزمونهای معمول بیوشیمیایی و آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مورد شناسایی قرار گرفتند. توانایی تولید کورلای/سلولز و تشکیل بیوفیلم در میان سویه های تأیید شده به ترتیب با استفاده از آزمون کیفی قرمز کنگو و آزمون کمّی میکروتیتر پلیت مورد بررسی قرار گرفت. تولید آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف و همچنین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های مولد بیوفیلم با استفاده از آزمون انتشار دیسک با استفاده از دستورالعملهای CLSI تعیین گردید.*

یافته ها: *در مجموع ۸۵ سویه (۷۶ درصد) بر اساس آزمونهای استاندارد بیوشیمیایی و مولکولی، به عنوان اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک مورد شناسایی و تأیید قرار گرفتند. فراوانی سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم در این مطالعه بسیار بالا بود و ۵۸ سویه (۶۸ درصد) با تولید کورلای و/یا سلولز، قادر به تشکیل بیوفیلم بودند. مقاومت آنتی بیوتیکی بسیار بالایی (۹۹-۸۰ درصد) در میان سویه های مولد بیوفیلم نسبت به آمپی سیلین، سفوتاکسیم، سفپودوکسیم، سفتازیدیم و سفتریاکسون مشاهده شد. همچنین، ۶۲ درصد سویه های اشرشیا کلای بیوفیلم مثبت، قادر به تولید آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف بودند و ارتباط معنی داری میان تولید بیوفیلم قوی و آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف مشاهده گردید.*

نتیجه گیری: *فراوانی بالای سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک با توانایی تولید همزمان بیوفیلم و آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف جداسازی شده از افراد مبتلا به عفونت ادراری در زاهدان، ممکن است ناشی از وضعیت اقتصادی-اجتماعی نامناسب و همچنین آب و هوای گرم این شهر باشد.*

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

مقدمه

عفونتهای بیمارستانی از عوامل عمدهٔ مرگ و میر بیماران در مراکز درمانی بوده که هزینه های قابل توجهی را بر بیمار و سیستم بهداشت و درمان تحمیل نموده است. عفونتهای مجاری ادراری از شایعترین عفونتهای بیمارستانی در سنین مختلف بوده که عدم درمان مناسب آنها، منجر به بروز عوارض خطرناکی از جمله اختلالات دستگاه ادراری، فشار خون، اورمی و زایمان زودرس خواهد شد (۱). شدت عفونت ادراری، به مستعد بودن میزبان و بیماریزایی باکتری بیماریزا بستگی دارد، به طوریکه در افراد با مشکلات پزشکی زمینه ای و یا برخی اختلالات آناتومیک در مجرای ادراری، میزان بروز عفونت ادراری بیشتر است (۲). باکتری *اشرشیا کلای* جزئی از نرمال بایوتا روده می باشد ولی بعضا می تواند با خروج از روده و تهاجم به سایر بافتها سبب ایجاد عفونت گردد. سویه های بیماریزای *اشرشیا کلای*، بر اساس نوع عوامل بیماریزایی که حمل می کنند، به پاتوتایپهای مختلف گروه بندی می شوند که در هر یک از این تایپها، الگوی اتصال به سلول، تولید توکسین، قدرت تهاجم و ... متفاوت می باشد (۳, ۴). در میان سویه های بیماریزای خارج روده ای *اشرشیا کلای*، سویه های پاتوتایپ اوروپاتوژنیک، شایعترین عامل بیماریزا در انسان محسوب می شوند (۵)، به طوریکه این سویه ها با دارا بودن فیمبریه قادرند به سلولهای پوششی دستگاه ادراری حمله کرده و در درون آنها تکثیر یابند و حدود ۹۰ درصد عفونتهای ادراری اکتسابی را به خود اختصاص دهند (۶).

عوامل بیماریزای متعددی در باکتری *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک وجود دارد که موجب ساکن شدن این باکتری در مخاط مجرای ادراری و تهاجم و بیماریزایی آن می شوند. توانایی اتصال باکتری به بافتهای میزبان از مهمترین عوامل بیماریزایی به شمار می روند که با ساکن شدن و تشکیل بیوفیلم باکتریایی در سطح سلولهای پوششی مجاری ادراری، منجر به پایدار شدن باکتری در برابر جریان ادراری و همچنین هجوم باکتری به بافت پوششی مثانه می شود و زمینه بروز واکنشهای التهابی را فراهم می سازد. با توجه به مطالعات صورت گرفته مختلف، فیمبریه به عنوان عامل واسطه جهت اتصال سویه های اوروپاتوژنیک *اشرشیا کلای* به سلولهای دستگاه ادراری میزبان در اغلب موارد شناخته می شود (۷, ۸). از طرف دیگر، فرآیند اتصال منجر به تحریک ورود باکتری به داخل سلولهای بافت پوششی ادراری می شود و شرایط ایجاد ساختارهای بیوفیلمی داخل سلولی را برای این باکتری فراهم می سازد؛ که این مورد یکی از دلایل پایداری بیش از حد این باکتری و عود مجدد و پرتکرار عفونتهای ادراری به شمار می رود (۸, ۹). توانایی تشکیل بیوفیلم و حضور برخی ساختارهای اختصاصی با نقش اتصالی در سطح سلول، در بسیاری از میکروارگانیسمها مشاهده می شود (۱۰). اولین مرحله در تشکیل بیوفیلم، اتصال باکتریها به یکدیگر یا سطوح زنده و غیرزنده محیط می باشد که موفقیت در این فرآیند، وابسته به عوامل چسبندگی موجود در سطح باکتری است. فیمبریه مجعد (کورلای) و پلی ساکارید سلولز، به عنوان دو بخش اصلی تشکیل دهنده ماتریکس بیوفیلمی، از مهمترین عوامل دخیل در تشکیل بیوفیلم در *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک محسوب می شوند (۱۱). در کنار سایر سازکارهای مقاومت ضدمیکروبی (به ویژه تولید آنزیمهای بتالاکتامازی در باکتری *اشرشیا کلای*)، حضور ماتریکس خارج سلولی موجود در ساختار بیوفیلم در این سویهها (با محافظت از باکتری در برابر عوامل ضدمیکروبی و خطوط دفاعی سیستم ایمنی دستگاه ادراری) نقش مهمی در مقاومت ضدمیکروبی و افزایش شدت عفونت ایفا می نماید که می تواند منجر به ایجاد عفونتهای مزمن و مشکلات درمانی شود. در سویه های بیماریزای *اشرشیا کلای*، فیمبریه مجعد معمولاً همراه با سلولز، بیان می شود. سنتز این دو ساختار در میان سویه های بیمارستانی *اشرشیا کلای* بسیار معمول است که بیانگر نقش مهم آنها در برهمکنشهای میزبان-عامل بیماریزا می باشد (۱۲, ۱۳).

مقاومت ضدمیکروبی در بسیاری از باکتریها از طریق جهشهای ژنی و یا کسب ژنهای مقاومت از سایر باکتریها صورت می گیرد. طیف اثر گسترده و سمّیت انتخابی بالای آنتی بیوتیکهای بتالاکتامی، باعث شده تا این گروه آنتی بیوتیکی جایگاه ویژه ای در درمان عفونتهای باکتریایی از جمله عفونتهای ادراری داشته باشند. تولید آنزیمهای غیرفعال کننده آنتی بیوتیک، از مهمترین سازکارهای مقاومت در باکتریها است که در این میان تولید بتالاکتامازها مهمترین سازکار مقاومت در برابر آنتی بیوتیکهای بتالاکتامی محسوب می شود. در حال حاضر، شیوع بالای عفونتهای ادراری اکتسابی از جامعه توسط سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مولد آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) و مقاومت این سویه ها به کلاسهای مختلف آنتی بیوتیکهای بتالاکتامی، منجر به بروز مشکلات درمانی عدیده ای شده است (۱۴, ۱۵). از مهمترین دلایل مقاومت بالای این سویه ها به آنتی بیوتیکهای بتالاکتامی، مصرف بیش

از حد و طولانی مدت سفالوسپورینهای وسیع الطیف می باشد. از طرف دیگر، در کنار مقاومت بالای سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک به طیف وسیعی از سفالوسپورینها، قرار گرفتن ژنهای ESBL بر روی پلاسمیدهای حامل ژنهای مقاومت به سایر کلاسهای آنتی بیوتیکی از جمله آمینوگلیکوزیدها، کلرامفنیکل، سولفونامیدها و تتراسایکلین، درمان عفونتهای حاصل از این سویه ها را با مشکل مواجه کرده است و باعث بروز مرگ و میر بالا و تحمیل هزینه های اقتصادی بالایی بر جامعه شده است (۱۶). در حال حاضر، شیوع بیش از حد سویه های *اشرشیا کلای* مولد آنزیمهای ESBL در عفونتهای ادراری، نگرانیهای زیادی را در جامعه پزشکی در پی داشته است. بر اساس ارزیابی اپیدمیولوژی مولکولی، شناسایی سویه های *اشرشیا کلای* مولد بتالاکتاماز و مقاوم به چند دارو، می تواند کمک مؤثری در جهت انتخاب داروهای مناسب و مهار شیوع سویه های مقاوم باشد (۱۷).

اگر چه امروزه بحث مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتریهای بیماریزا، به عنوان یک مشکل اساسی در جوامع علمی مطرح می شود، ولی با توجه به ماهیت قابل انتقال بودن همزمان ژنهای بیماریزایی مانند ژنهای بیوفیلمی با ژنهای مقاومت، انتقال این ژنها به سویه های کامنسال و انتشار در میان این سویه ها، نگرانی و خطرات بسیار بیشتری را در پی خواهد داشت. در این میان، باکتری *اشرشیا کلای* به عنوان مهمترین و فراوانترین باکتری ساکن لوله گوارش، واجد روشهای بسیار کارآمد و متنوعی برای اکتساب شاخصهای بیماریزایی و مقاومت آنتی بیوتیکی می باشد که می تواند به عنوان یک مخزن برای انتشار این ژنها به سایر سویه ها یا حتی گونه های باکتریایی عمل کند. گسترش بیش از حد مقاومت در برابر آنتی بیوتیکهای بتالاکتام وسیع الطیف طی دو دهه اخیر، به میزان زیادی به گسترش همین پلاسمیدهای حامل ژنهای ESBLs نسبت داده می شود؛ به طوریکه تاکنون بیش از ۲۰۰ نوع از آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف در سراسر دنیا شناسایی شده است (۱۸). طی سالیان اخیر، سازکارهای مقاومت آنتی بیوتیکی مختلفی در باکتری *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک تکامل پیدا کرده است که منجر به کاهش شدید حساسیت در برابر آنتی بیوتیکهای خط اول درمان عفونتهای می شود. با توجه به نقش بسیار مهم بیوفیلم در بروز مقاومتهای آنتی بیوتیکی، بررسی ارتباط کمّیت و کیفیت بیوفیلم تشکیل شده با توانایی تولید آنزیمهای بتالاکتامازی در جمعیت باکتریایی بیوفیلم ضروری است و می تواند به انتخاب راهکار درمانی مناسب و پیشگیری از عود عفونت کمک کند. همچنین یافتن راهکارهای درمانی جدید با اثر مهاری بر روی مراحل مختلف تشکیل بیوفیلم جهت درمان و ریشه کن کردن عفونتهای ناشی از این باکتری به ویژه سویه های مولد بیوفیلم از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می باشد (۱۹). بر این اساس، این مطالعه با هدف بررسی ارتباط تولید کمّی و کیفی بیوفیلم با تولید و شیوع آنزیمهای بتالاکتاماری در جدایه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک جداسازی شده از بیماران مبتلا به

عفونت ادراری در بیمارستان امام علی (ع) در شهر زاهدان در طی سال ۱۳۹۶ به انجام رسیده است.

مواد و روشها

شناسایی جدایه های *اشرشیا کلای*

شناسایی اولیه ۱۱۲ جدایه *اشرشیا کلای* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری در بیمارستان امام علی (ع) زاهدان، با کشت هر جدایه بر روی محیطهای کشت انتخابی ژلوز مک کانکی (Merck, Germany) و ژلوز ائوزین متیلن بلو (Merck, Germany) انجام شد و سپس شناسایی و تأیید نهایی سویه های مشکوک به *اشرشیا کلای* با آزمون PCR و با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *tuf*A صورت گرفت. توالی پرایمرها Tuf F: 5′- TGGTTGATGACGAAGAGCTG و Tuf R: 5′- GCTCTGGTTCCGGAATGTAA و طول قطعه مورد انتظار ۲۰۰ جفت باز بود (۲۰).

بررسی تولید بیوفیلم

به منظور تعیین توانایی و تولید بیوفیلم در میان سویه های تأیید شده *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، از آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو بر اساس دستورالعمل Romling و همکاران (۲۱) و آزمون کمّی میکروتیتر پلیت بر اساس دستورالعمل O'Toole و همکاران انجام گرفت (۲۲).

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی

حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت در برابر آنتی بیوتیکهای رایج مورد استفاده در درمان عفونتهای ادراری، با روش استاندارد انتشار دیسک بر روی محیط ژلوز مولر هینتون (Merck- Germany) و بر اساس دستورالعمل CLSI مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۳). آنتی

بیوتیکهای آزمایش شده در این مطالعه آمپی سیلین (10 µg)، آموکسی سیلین/کلاوولانیک اسید (30/10 µg)، آمیکاسین (30 µg)، افلوکساسین (5 µg)، ایمی پنم (10 µg)، پیپراسیلین/تازوباکتام (100/10 µg)، جنتامایسین (10 µg)، سفپودوکسیم (10 µg)، سفتازیدیم (30 µg)، سفتریاکسون (30 µg)، سفوتاکسیم (30 µg)، سفوکسیتین (30 µg)، سولفامتوکسازول/تری متوپریم (30/10 µg)، سیپروفلوکساسین (5 µg)، کانامایسین (30 µg)، لووفلوکساسین (5 µg) و مروپنم (10 µg) بودند که از شرکت Cypress diagnostics (بلژیک) تهیه شدند. بر اساس دستورالعمل CLSI از سویه *اشرشیا کلای* ATCC 25922 به عنوان کنترل در آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی استفاده شد.

بررسی فنوتایپی تولید آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL)

بررسی فنوتایپی تولید آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) در سویه های *اشرشیا کلای* ادراری بیوفیلم مثبت، با استفاده از آزمون تأییدی دیسک ترکیبی انجام شد. بر این اساس، ابتدا از سوسپانسیون باکتریایی با کدورت نیم مک فارلند هر سویه، با استفاده از سواپ استریل بر روی محیط ژلوز مولر هینتون به صورت انبوه کشت داده شد و سپس دیسکهای آنتی بیوتیکی سفوتاکسیم (30 µg)، سفوتاکسیم-کلاوولانات (30/10 µg)، سفتازیدیم (30 µg) و سفتازیدیم-کلاوولانات (30/10 µg)، به فاصله حداقل ۲/۵ سانتیمتری از هم، بر روی سطح محیط قرار داده شدند و گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انجام گردید. تفسیر نتایج بر اساس معیارهای CLSI صورت گرفت (۲۳) و بر این اساس افزایش بیش از ۵ میلیمتر در قطر هاله عدم رشد در دیسک سفالوسپورین+کلاوولانیک اسید نسبت به دیسک سفالوسپورینی منفرد، به عنوان نشانه فنوتایپی تولید آنزیمهای ESBL در نظر گرفته شد. آزمون کنترل کیفیت، جهت شناسایی آنزیمهای ESBL، بر اساس دستورالعمل CLSI با استفاده از سویه *K. pneumoniae* ATCC700603 به عنوان کنترل مثبت، و سویه *E. coli* ATCC25922 به عنوان کنترل منفی انجام شد.

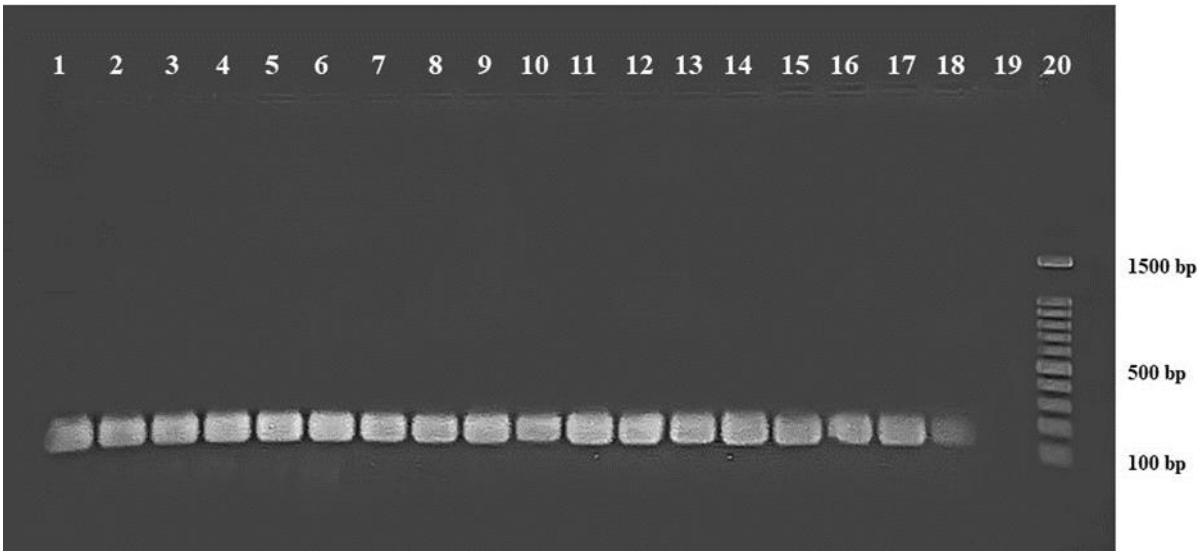
تجزیه و تحلیل داده های آماری

به منظور انجام بررسیهای آماری و تجزیه و تحلیل داده های به دست آمده در طی آزمونهای مختلف و همچنین جهت رسم تمامی نمودارها از نرم افزار GraphPad Prism 8 استفاده گردید.

نتایج

شناسایی جدایه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک

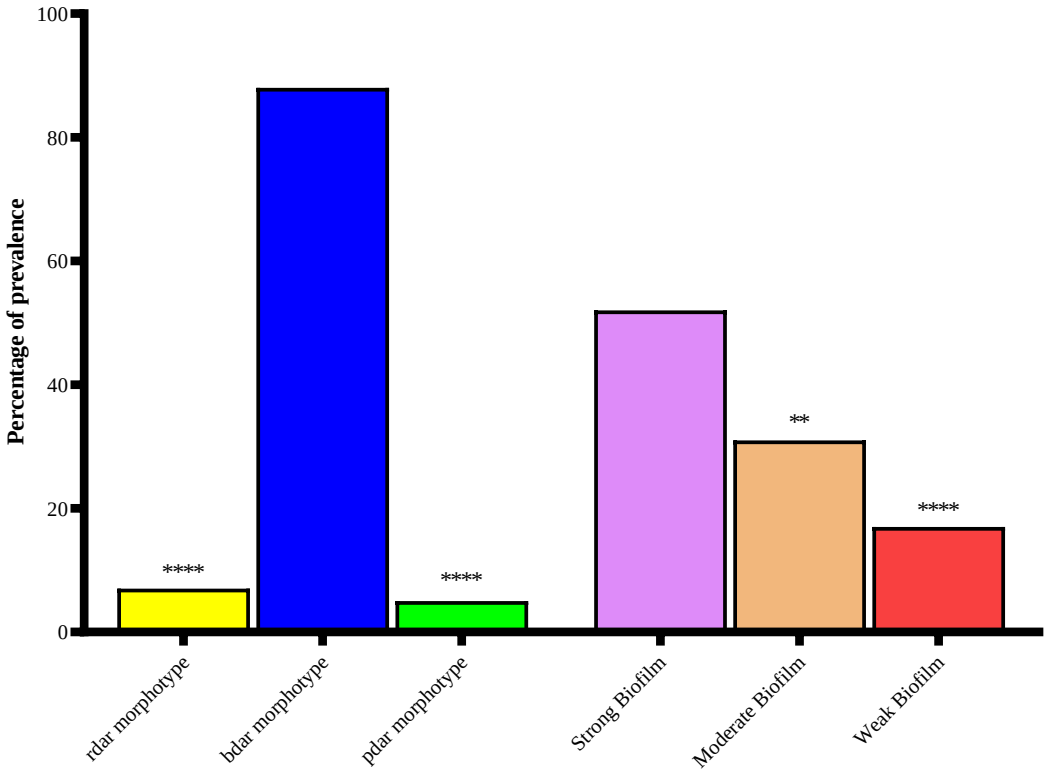
در مجموع از میان ۱۱۲ جدایه *اشرشیا کلای* جمع آوری شده از افراد بیمار مبتلا به عفونت ادراری در بیمارستان امام علی (ع) زاهدان در سال ۱۳۹۶، بر اساس آزمونهای شناسایی فنوتایپی اولیه، ۸۵ جدایه به عنوان سویه های مشکوک به *اشرشیا کلای* انتخاب شدند. تأیید نهایی سویه ها با استفاده از آزمون مولکولی PCR و پرایمر اختصاصی قطعه ژنی *tuf*A انجام شد که تمامی ۸۵ جدایه، به عنوان سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مورد تأیید قرار گرفتند (شکل ۱).



شکل ۱- محصول PCR ژن *tufA*. شماره ۱ تا ۱۸: جدایه های *اشرشیا کلای* مورد بررسی، شماره ۱۹: کنترل منفی و شماره ۲۰: نشانگر ۱۵۰۰ جفت بازی.

تعیین توانایی تولید بیوفیلم

در میان ۸۵ سویه *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، 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. در میان سویه های بیوفیلم مثبت، 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 (شکل ۱). همچنین بر اساس نتایج بررسی توانایی کمّی تولید بیوفیلم در 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 (شکل ۲).

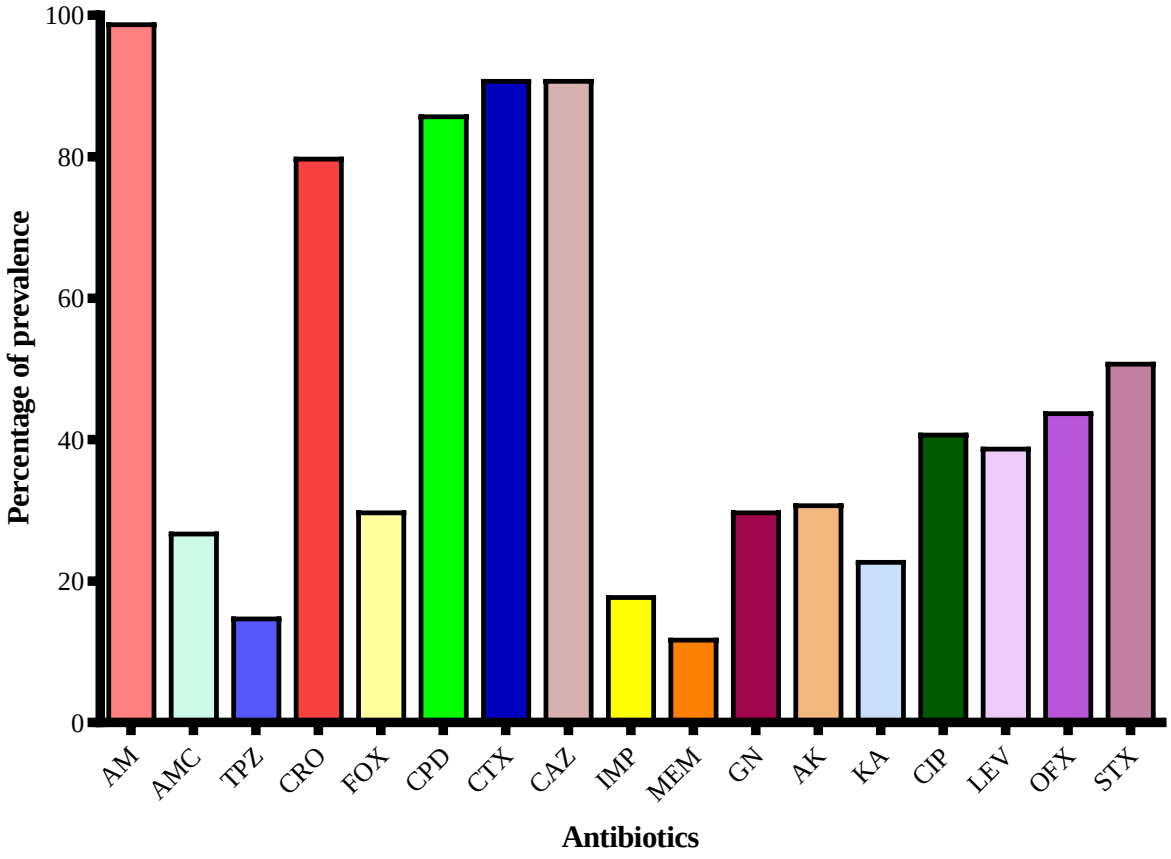


**Significant at $p \leq 0.004$ (strong biofilm VS moderate biofilm)
****Significant at $p < 0.0001$ (bdar VS rdar/ bdar VS pdar/ strong biofilm VS weak biofilm)

شکل ۲- فراوانی مورفوتایپها و گروههای بیوفیلمی در میان سویه های *اشرشیا کلای* مولد کورلای و سلولز.

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی

آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت در برابر ۱۷ آنتی بیوتیک مورد بررسی، وجود تنوع بالایی در مقاومت در برابر کلاسهای آنتی بیوتیکی مختلف و همچنین سطوح بالای مقاومت در برابر اغلب آنتی بیوتیکها را نشان داد. بر این اساس، سویه های *اشرشیا کلای* مقاومت بالایی در برابر آمپی سیلین (۹۹ درصد)، سفالوسپورینهای نسل سوم شامل؛ سفوتاکسیم (۹۱ درصد)، سفپودوکسیم (۸۶ درصد)، سفتازیدیم (۹۱ درصد) و سفتریاکسون (۸۰ درصد) نشان دادند. از طرف دیگر، سویه های *اشرشیا کلای* حساسیت بالایی در برابر مروپنم (۸۸ درصد)، پیپراسیلین/تازوباکتام (۸۵ درصد)، ایمی پنم (۸۲ درصد) و سفوکسیتین (۷۰ درصد) نشان دادند در میان آنتیبیوتیکهای غیربتالاکتامی، میزان مقاومت سویههای *اشرشیا کلای* در برابر داروهای آمینوگلیکوزیدی آمیکاسین، جنتامایسین و کانامایسین به ترتیب ۳۱، ۳۰ و ۲۳ درصد بود و همچنین میزان مقاومت سویههای *اشرشیا کلای* در برابر کینولونهای سیپروفلوکساسین، افلوکساسین و لووفلوکساسین به ترتیب ۴۱، ۴۴ و ۳۹ درصد بود (شکل ۳).



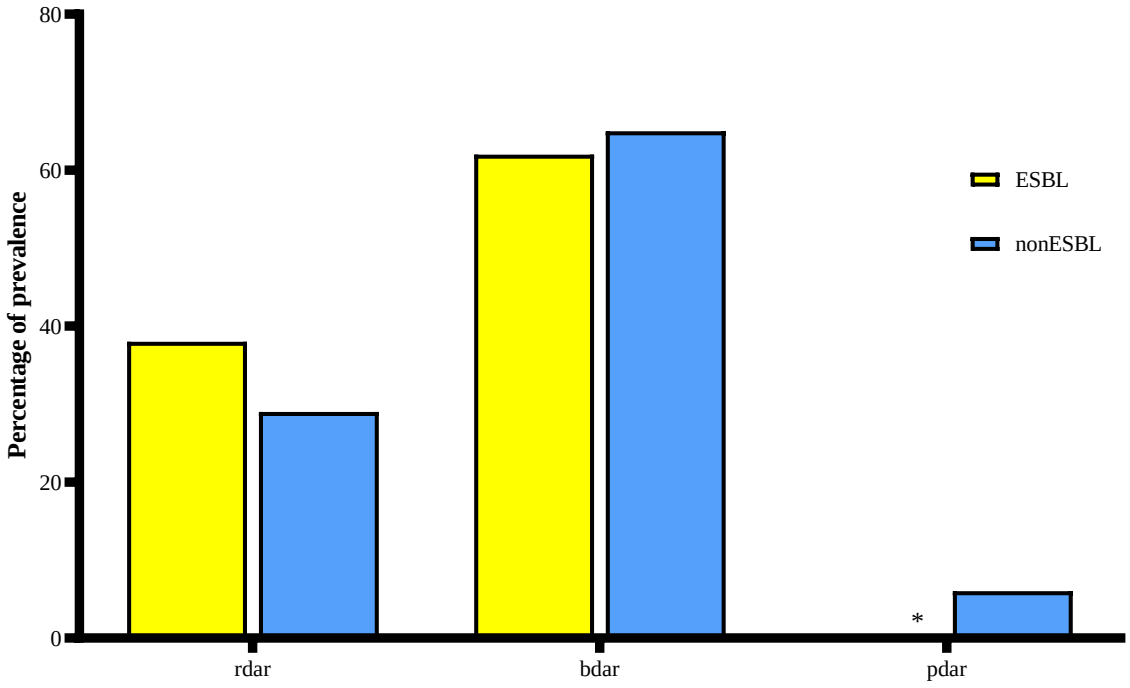
شکل ۳- میزان مقاومت سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت در برابر آنتی بیوتیکهای آزمایش شده.
"آمپی سیلین (AM)، آموکسی سیلین/کلاوولانیک اسید (AMC)، پیپراسیلین/تازوباکتام (TPZ)، سفوتاکسیم (CTX)، سفتازیدیم (CAZ)، سفتریآکسون (CRO)، سفوکسیتین (FOX)، سفپودوکسیم (CPD)، ایمی پنم (IMP)، مروپنم (MEM)، جنتامایسین (GN)، آمیکاسین (AK)، کانامایسین (KA)، سیپروفلوکساسین (CIP)، افلوکساسین (OFX)، لووفلوکساسین (LEV) و سولفامتوکسازول/تریمتوپریم (STX)"

شناسایی فنوتایپی تولید آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL)

با توجه به نتایج آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی، در میان ۵۸ سویه *اشرشیا کلای* ادراری بیوفیلم مثبت، ۵۴ سویه (۹۳ درصد) با نشان دادن مقاومت همزمان در برابر سه آنتی بیوتیک سفپودوکسیم، سفوتاکسیم و سفتازیدیم (با یا بدون مقاومت به سفوکسیتین) به عنوان سویه های با مقاومت سفالوسپورینی وسیع الطیف (ESCR) و با توانایی تولید بالقوه آنزیمهای ESBL در نظر گرفته شدند. سایر سویه های *اشرشیا کلای* (۴ سویه) با حساس یا نیمه حساس بودن در برابر سه آنتی بیوتیک سفپودوکسیم، سفوتاکسیم و سفتازیدیم و نشان دادن حساسیت در برابر سفوکسیتین، از نظر تولید ESBL، منفی در نظر گرفته شدند. بر این اساس، شناسایی آنزیمهای ESBL در سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم، با استفاده از آزمونهای فنوتایپی تشخیصی-تأییدی انجام شد که با توجه به نتایج به دست آمده، ۳۶ سویه (۶۲ درصد) با نشان دادن افزایش بیش از ۵ میلیمتری قطر هاله عدم رشد در برابر دیسک سفتازیدیم/کلاوولانیک اسید و دیسک سفوتاکسیم/کلاوولانیک اسید در مقایسه با دیسکهای سفتازیدیم و سفوتاکسیم منفرد، به عنوان سویه های مولد آنزیمهای ESBL در نظر گرفته شدند.

بررسی ارتباط توانایی تشکیل بیوفیلم و تولید آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف

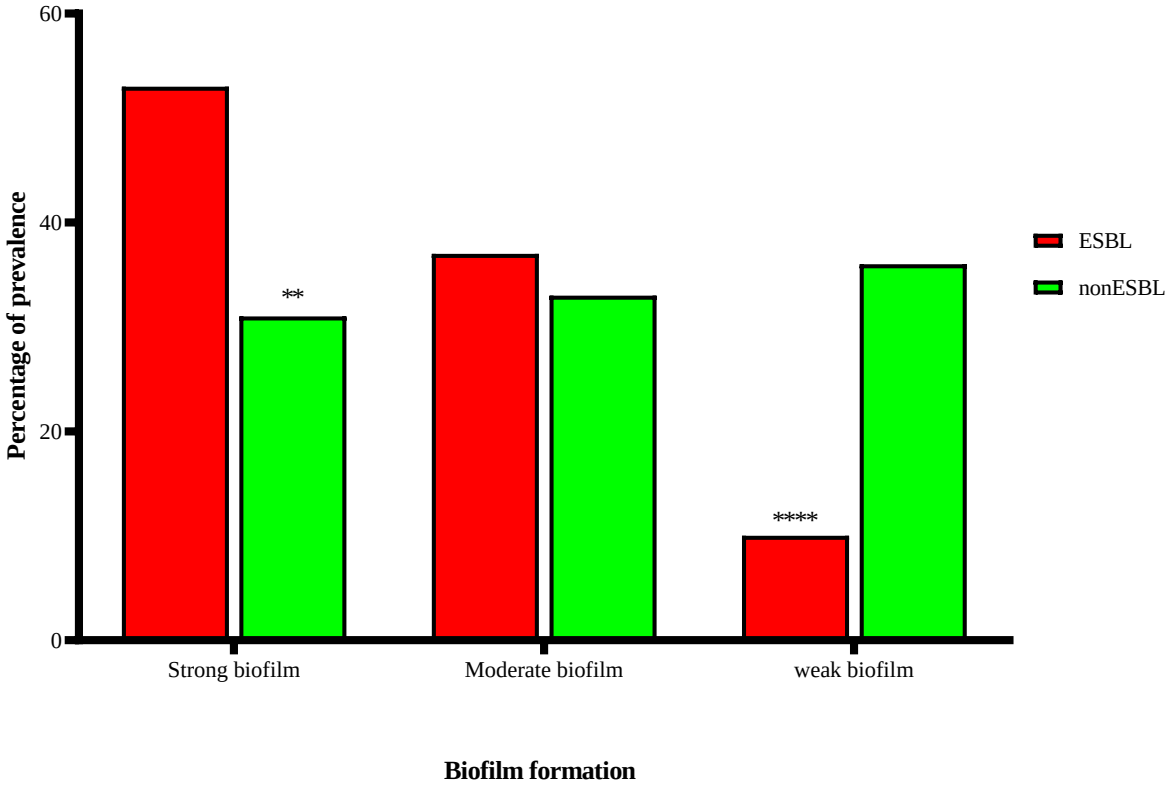
بررسی ارتباط مورفوتایپهای مختلف قرمز کنگو و توانایی تولید آنزیمهای ESBL در سویه های *اشرشیا کلای*، ارتباط قابل توجهی میان مورفوتایپهای rdar و bdar و توانایی تولید ESBL را نشان داد، بطوریکه ۳۸ درصد از سویه های ESBL مثبت، واجد مورفوتایپ rdar و ۶۲ درصد آنها واجد مورفوتایپ bdar بودند. با این وجود، ارتباط آماری معنی داری میان فراوانی ESBL و nonESBL در سویه های واجد مورفوتایپ rdar (P=۰/۲۳۰۶) و سویه های واجد مورفوتایپ bdar (P=۰/۷۶۹۱) مشاهده نگردید، درحالیکه فراوانی nonESBL در سویه های واجد مورفوتایپ pdar بطور معنی داری بالاتر از ESBL بود (P=۰/۰۲۸۹) (شکل ۴).



*Significant at $p \leq 0.03$ (nonESBL VS ESBL)

شکل ۴- توزیع فراوانی آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) در میان مورفوتایپهای مختلف سویه های *اشرشیا کلای*.

همچنین بررسی ارتباط توانایی تولید آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف و توانایی تولید بیوفیلم، نشان دهنده ارتباط قابل توجهی میان سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم قوی و تولید ESBL بود. بر این اساس، در میان سویه های *اشرشیا کلای* با توانایی تولید ESBL، فراوانی سویه های بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف به ترتیب ۵۳، ۳۷ و ۱۰ درصد بود، که این نتایج مؤید وجود اختلاف آماری معنی دار در توانایی تولید ESBL، میان سویه های مولد بیوفیلم قوی و ضعیف ($P<۰/۰۰۰۱$) و همچنین میان سویه های مولد بیوفیلم متوسط و ضعیف ($P<۰/۰۰۰۱$) بود. از طرف دیگر، با توجه به مقایسه فراوانی ESBL و nonESBL در سویه های متعلق به هریک از گروههای بیوفیلمی، در سویه های بیوفیلم قوی، فراوانی ESBL بطور معنی داری بالاتر از nonESBL بود ($P=۰/۰۰۲۵$)، در حالیکه در سویه های بیوفیلم ضعیف، شیوع nonESBL بطور قابل توجهی بالاتر بود ($P<۰/۰۰۰۱$) (شکل ۵).

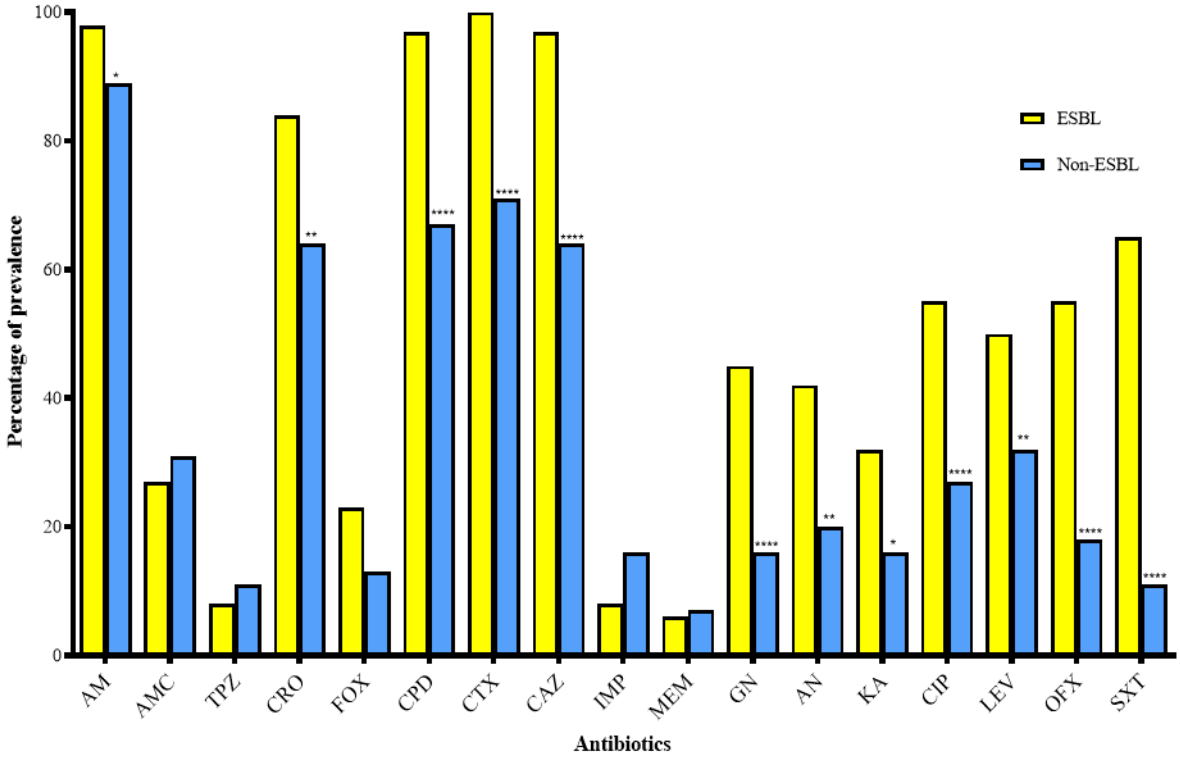


**Significant at p ≤ 0.003 (ESBL VS nonESBL)
****Significant at p < 0.0001 (nonESBL VS ESBL)

شکل ۵- توزیع فراوانی تولید ESBL در میان گروههای بیوفیلمی مختلف در سویه های *اشرشیا کلای*.

بررسی ارتباط مقاومت آنتی بیوتیکی و تولید آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های *اشرشیا کلای* تولید کننده ESBL، میزان مقاومت بالاتر این سویه ها را در برابر اغلب آنتی بیوتیکهای آزمایش شده، نسبت به سویه های nonESBL نشان داد (شکل ۶).



*Significant at $p \leq 0.02$
**Significant at $p \leq 0.002$
****Significant at $p < 0.0001$

شکل ۶- توزیع فراوانی تولید ESBL در میان سویه های *اشرشیا کلای* مقاوم به آنتی بیوتیکهای آزمایش شده.

"آمپی سیلین (AM)، آموکسی سیلین/کلاوولانیک اسید (AMC)، پیپراسیلین/تازوباکتام (TPZ)، سفوتاکسیم (CTX)، سفتازیدیم (CAZ)، سفتریاکسون (CRO)، سفوکسیتین (FOX)، سفپودوکسیم (CPD)، ایمی پنم (IMP)، مروپنم (MEM)، جنتامایسین (GN)، آمیکاسین (AK)، کانامایسین (KA)، سیپروفلوکساسین (CIP)، افلوکساسین (OFX)، لووفلوکساسین (LEV) و سولفامتوکسازول/تریمتوپریم (STX)"

همچنین ارتباط قابل توجهی میان فنوتایپ MDR با تولید ESBL مشاهده شد، به طوریکه ۸۴ درصد سویه های با مقاومت دارویی چندگانه، قادر به تولید ESBL بودند.

بحث

اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک یکی از پاتوتایپهای *اشرشیا کلای* بیماریزای خارج روده ای به شمار می رود که به عنوان عامل اصلی ایجاد عفونتهای مجاری ادراری اکتسابی از جامعه (۷۰ تا ۹۵ درصد) و نیز بخش عمده ای از عفونتهای ادراری بیمارستانی (۵۰ درصد) شناخته می شود (۲۴). یکی از ویژگیهای مهم عفونتهای ادراری ناشی از *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، عود عفونت حاصل از تولید بیوفیلم و همچنین تشکیل اجتماعات باکتریایی داخل سلولی توسط این باکتری می باشد (۲۵). بر این اساس، بررسی عوامل دخیل در تشکیل بیوفیلم و استفاده از روشهای مناسب و سریع برای غربالگری باکتریهای مولد بیوفیلم ضروری است و می تواند به انتخاب راهکار درمانی مناسب و پیشگیری از عود عفونت کمک کند. فراوانی بالای سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک تولید کننده کورلای و سلولز در این مطالعه و همچنین توانایی تولید بیوفیلم قوی و متوسط در اغلب سویه ها، مؤید نقش مهم بیوفیلم در بیماریزایی این باکتری است.

اساس درمان مناسب در عفونتهای ادراری، انتخاب یک آنتی بیوتیک مناسب با کارآیی و اثربخشی بالا می باشد. انتخاب آنتی بیوتیک باید بر اساس نوع پاتوژن، الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی، مکانیسم مقاومت آنتی بیوتیکی، میزان تحمل به دارو و ایمنی بیمار انجام گردد. با توجه به افزایش روزافزون مصرف آنتی بیوتیک و متعاقب آن افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی و متفاوت بودن حساسیت *اشرشیا کلای* های جدا شده در هر منطقه، مطالعه بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری ضروری است و می تواند در انتخاب مناسبترین گزینه درمانی مؤثر باشد (۲۶). افزایش مقاومت سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک در برابر آنتی بیوتیکهای بتالاکتام به ویژه سفالوسپورینهای وسیع الطیف و کارباپنمها در سراسر دنیا گزارش شده است، که البته تفاوتهای جغرافیایی قابل توجهی در اپیدمیولوژی و شیوع انواع مختلف سازوکارهای مقاومت وجود دارد (۲۷, ۲۸).

اولین آنتی بیوتیکهای مورد استفاده در درمان عفونتهای ادراری، کینولونها و فلئوروکینولونها بوده اند، ولی بررسیهای اخیر در سراسر ایالات متحده و اروپا، افزایش میزان مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک در برابر تری متوپریم، سولفامتوکسازول و فلئوروکینولونها از جمله سیپروفلوکساسین را نشان داده است (۲۹). طی تحقیقات صورت گرفته در ایران، تاکنون بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک جداسازی شده از بیمارستانهای ایران مربوط به آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین (۸۰٪/۲)، تری متوپریم/سولفامتوکسازول (۷۶٪/۰)، تتراسایکین (۷۰٪/۸)، نالیدیکسیک اسید (۲۴٪/۵) و جنتامایسین (۱۵٪/۴) بوده است (۳۰). در این مطالعه سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت، مقاومت قابل ملاحظه ای به اغلب آنتی بیوتیکهای آزمایش شده نشان دادند، به طوریکه بیش از ۹۹ درصد سویه ها در برابر حداقل یک آنتی بیوتیک مقاوم بودند و ۶۷ درصد سویه ها به ۶ تا ۱۵ آنتی بیوتیک مختلف مقاومت همزمان نشان دادند که این میزان و تنوع مقاومتی بالا، آنها را به یک عامل خطر مهم در بهداشت عمومی این مناطق تبدیل کرده است. خصوصیات منحصر به فرد موجود در ساختار بیوفیلم از جمله جلوگیری از انتشار دارو با واسطه حضور ماتریکسی فشرده در اطراف باکتریها، افزایش میزان انتقال افقی ژنهای مقاومت بین باکتریهای بیوفیلم و وجود عوامل غیرفعال کننده آنتی بیوتیکها مانند تغییر غلظت یونهای فلزی یا تغییر در میزان pH محیط، در مجموع باعث افزایش میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در بیوفیلمهای باکتریایی شده است (۳۱).

یکی از عوامل اصلی مقاومت آنتی بیوتیکی در *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، پیدایش آنزیمهای بتالاکتاماز به ویژه بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) می باشد. در بیشتر مواقع مقاومت اکتسابی ناشی از بتالاکتامازها، منجر به ظهور مقاومت جدایه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک نسبت به طیف وسیعی از سایر آنتی بیوتیکها نظیر فلئوروکینولونها، آمینوگلیکوزیدها و .... می گردد و درمان عفونتهای حاصل از این باکتری را با مشکلات جدی روبرو می سازد (۳۲). ژنهای بتالاکتامازی، به ویژه ژنهای ESBLs در باکتری *اشرشیا کلای*، یکی از عوامل مؤثر در افزایش مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای بتالاکتام از جمله سفالوسپورینهای وسیع الطیف است. سویه هایی حامل ژنهای بتالاکتامازی باعث افزایش قابل توجه میزان مرگ و میر افراد مبتلا شده اند، و ادامه روند رو به رشد ایجاد چنین مقاومتهایی، جامعه را با خطرات جدی مواجه خواهد کرد (۳۳). در حال حاضر، باکتریهای مولد ESBLs از اهمیت خاصی در راهبرد درمانی برخوردار می باشند، که این موضوع به علت شکستهای درمانی ناشی از تجویز آنتی بیوتیک، بدون انجام آزمون تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی است که خود باعث افزایش مرگ و میر و طولانی شدن زمان بستری و

افزایش هزینه درمان می گردد. بنابراین شناسایی سریع سویه های مولد ESBL در آزمایشگاههای میکروبشناسی، بسیار مهم و ضروری است. با توجه به نتایج این مطالعه که بیانگر حضور سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک با توانایی تولید آنزیمهای ESBL و بیوفیلم قوی و همچنین مقاومت آنتی بیوتیکی بالا بود، بسیار مقتضی است که آزمایشگاهها برای نمونه های مربوط به عفونت ادراری، همراه با انجام آزمون معمول تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی به روش انتشار دیسک، با انجام آزمونهای غربالگری و تأییدی، به بررسی توان تولید ESBL پرداخته و بر اساس نتایج حاصله، راهکارهای درمانی مناسب پیشنهاد نمایند.

استفاده از دیسکهای ترکیبی، از روشهای متداول تشخیص فنوتایپی بتالاکتامازها می باشد و کارآیی این روش در مطالعات متعددی تأیید شده است، به طوریکه Lin و همکاران (۳۴) نشان دادند که اغلب جدایه های *اشرشیا کلای* مولد ESBL (۹۸/۶ درصد)، با استفاده از دیسک سفوتاکسیم با یا بدون کلاوولانیک اسید قابل تشخیص می باشند. در مطالعه حاضر با استفاده از روش دیسک ترکیبی، فنوتایپ ESBL مثبت در ۶۲ درصد سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت یافت شد. فراوانی جدایه های خانواده *انتروباکتریاسه* مولد ESBLs در آسیا ۹۰-۵۱ درصد گزارش شده است (۳۵). فراوانی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک ESBL مثبت در این مطالعه، کمتر از مطالعات صورت گرفته در هند (۶۶ درصد) (۳۶)، قطر (۸۳ درصد) (۳۷) و ایران (۸۹ درصد) (۳۸) و بیشتر از مطالعات گزارش شده در الجزایر (۹ درصد) (۳۹)، ایالات متحده (۷-۱۵ درصد) (۴۰) و بخشهای مختلف ایران (۳۲ درصد) (۴۱) و (۲۹ درصد) (۴۲) بود. این تنوع در نتایج، ممکن است به علت اختلاف در وضعیت بهداشتی و اقلیمی منطقه جغرافیایی، سیاستهای کنترل عفونت، زمان و منبع نمونه برداری، روش تشخیصی استفاده شده، دیسکهای آنتی بیوتیکی مورد استفاده و همچنین خصوصیات جمعیت مورد مطالعه مانند تاریخچه و مدت زمان بیماری و سن و جنس بیمار باشد. علاوه بر آن، بر اساس نتایج این مطالعه همبستگی بالایی میان توانایی تولید فیمبریه مجعد/سلولز و تشکیل بیوفیلم با تولید ESBL در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک دیده شد، به طوریکه ۷۰، ۶۱ و ۲۷ درصد سویه های به ترتیب بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف؛ توانایی تولید آنزیمهای ESBL را نشان دادند. بر اساس مطالعات گذشته، تشکیل بیوفیلم باعث افزایش انتقال افقی ژنهای بتالاکتامازی در میان سویه های *اشرشیا کلای* شده، چرا که ماتریکس بیوفیلمی، با واسطه حضور ترکیباتی مانند فیمبریه مجعد و سلولز که باعث استحکام ساختار بیوفیلم می شوند؛ منجر به افزایش قابلیت انتقال عناصر ژنتیکی می شود (۴۳). همچنین سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک ESBL مثبت در مقایسه با سویه های ESBL منفی در این مطالعه، مقاومت بیشتری در برابر اغلب آنتی بیوتیکهای مورد بررسی نشان دادند، به طوریکه ۸۴ درصد سویه های با مقاومت دارویی چندگانه، قادر به تولید ESBL بودند؛ که این ویژگی از نگران کننده ترین جنبه های باکتریهای مولد آنزیمهای بتالاکتامازی است.

بیماریزایی باکتریها و الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی در هر منطقه جغرافیایی، ارتباط مستقیمی با شرایط اجتماعی-اقتصادی افراد جمعیت و فاکتورهای محیطی آن منطقه دارد. تاکنون مطالعات زیادی در ارتباط با عفونتهای ادراری *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک و مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری در ایران صورت گرفته است، اما اکثر این مطالعات با تمرکز بر شهرها و مناطق مرکزی ایران انجام شده است (۴۴, ۴۵). با توجه به وضعیت اجتماعی و میزان دسترسی به امکانات درمانی-بهداشتی در شهرهای واقع شده در استانهای مرزی مانند زاهدان؛ فراوانی بالای عفونتهای میکروبی و همچنین گسترش بیش از حد عوامل مقاومت آنتی بیوتیکی در این مناطق قابل انتظار است. فراوانی بالای سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت، کمّیت بالای بیوفیلم تولید شده در این سویه ها، مقاومت بسیار بالای سویه ها به اغلب کلاسهای آنتی بیوتیکی رایج در درمان عفونتهای ادراری و همچنین شیوع بالای آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک این مطالعه در مقایسه با سایر مطالعات صورت گرفته در مناطق دیگر ایران، مؤید اهمیت شرایط اجتماعی-اقتصادی و فاکتورهای محیطی به عنوان یک عامل مهم در گسترش عوامل بیماریزایی و ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی است.

نتیجه گیری

گسترش و شیوع سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مولد آنزیمهای بتالاکتامازی و انتقال افقی ژنهای مقاومت، از چالشهای مهم در مدیریت درمان عفونتهای ادراری محسوب می شود. تشکیل بیوفیلم در *اشرشیا کلای* ارتباط تنگاتنگی با تولید ESBL، مقاومت ضدمیکروبی و همچنین پایداری و عود عفونتهای ادراری دارد. شیوع بالای سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک با توانایی تولید بیوفیلم قوی و آنزیمهای ESBL و دارای مقاومت ضدمیکروبی بالا، از یافته های اصلی مطالعه حاضر در این منطقه جغرافیایی از ایران به شمار می رود. همچنین، ارتباط قابل توجهی میان تولید بیوفیلم با MDR و ESBL مشاهده شد که یکی از

نگرانیهای مهم در بهداشت عمومی است و نیاز به توجه بیشتری دارد. همچنین بر اساس نتایج این مطالعه، شرایط اجتماعی-اقتصادی موجود در مناطق جنوب شرقی ایران مانند شهر زاهدان که با مشکلات متعدد از جمله دسترسی محدود به امکانات بهداشتی، ورود افراد مهاجر زیاد از کشورهای افغانستان و پاکستان و همچنین شرایط اقلیمی و آب و هوایی گرم و خشک مواجه هستند، می تواند به عنوان فاکتور تسهیل کننده انتشار وسیع سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف عمل کند. بنابراین بررسی و تشخیص بیوفیلم و آنزیمهای بتالاکتامازی با استفاده از روشهای مناسب و سریع کاملاً ضروری است و می تواند به انتخاب راهکار درمانی مناسب و پیشگیری از عود عفونت کمک نماید.

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.

REFERENCE

1. Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, Gillespie B, Sobel JD. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. Annals of Epidemiology. 2000;10(8):509-15.
2. Klein RD, Hultgren SJ. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. Nature Reviews Microbiology. 2020;18(4):211-26.
3. Gupta K, Stamm WE. Urinary tract infections .In: Dale DC, Federman DD, editors. ACP Medicine. New York: WebMD; 2005
4. Orskov I, Orskov F. *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. The Journal of Hygiene. 1985;95(3):551–75.
5. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology. 2014;2:123-40.
6. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. International Journal of Nephrology. 2012;2012:681473.
7. Foxman B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. Infectious Disease Clinics of North America. 2014;28(1):1-13.
8. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Experimental and *Molecular Pathology*. 2008;85:11-9.
9. Ribet D, Pascale C. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. Microbes and Infection. 2015;17(3):173-83.
10. Mah T.FC, O'toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology. 2001;9(1):34-9.
11. 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;2(4):450-64.
12. Römling U. Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. Cellular and Molecular Life Sciences. 2005;62:1234–46.
13. Hammar M, Arnqvist A, Bian Z, Olsen A, Normark S. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and Congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. Molecular Microbiology. 1995;18:661–70.

14. Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. Clinical Orthopaedics and Related Research. 437:41-7.
15. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, et al. β-lactamases and β-lactamase inhibitors in the 21st century. Journal of Molecular Biology. 2019;431(18):3472-500.
16. Jacoby GA. Genetics of extended-spectrum beta-lactamases. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 1994;13(Suppl1):S2-S11.
17. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clinical Microbiology Reviews. 2005;18(4):657-86.
18. Bush K. Past and present perspectives on β-lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2018;62(10):e01076-18.
19. Bischoff S, Walter T, Gerigk M, Ebert M ,Vogelmann R. Empiric antibiotic therapy in urinary tract infection in patients with risk factors for antibiotic resistance in a German emergency department. BMC Infectious Diseases. 2018;18(1):56.
20. 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;104(24):10199- 204.
21. 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;180(3):722-31.
22. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. Journal of Visualized Experiments. 2011;30(47):2437.
23. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th ed. Pennsylvania: Wayne; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
24. Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. American Journal of Medicine. 2002 Jul;113 14-9.
25. Naziri Z, Kilegolan JA, Moezzi MS, Derakhshandeh A. Biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli*: a complicating factor for treatment and recurrence of urinary tract infections. Journal of Hospital Infection. 2021;117:9-16.
26. Abou Heidar NF, Degheili JA, Yacoubian AA, Khauli RB. Management of urinary tract infection in women: A practical approach for everyday practice. Urology Annals. 2019;11(4):339-46.
27. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. International Journal of Medical Microbiology. 2010;300(6):371-9.
28. Erb A, Stürmer T, Marre R, Brenner H. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2007;26(2):83-90.
29. Bader MS, Loeb M, Leto D, Brooks AA. Treatment of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance and new antimicrobial agents. Postgraduate Medical Journal. 2020;132(3):234-50.
30. Alizade H. Escherichia coli in Iran: An Overview of Antibiotic Resistance: A Review Article. Iranian Journal of Public Health. 2018;47(1):1-12.
31. Gebreyohannes G, Nyerere A, Bii C, Sbhatu DB. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. Heliyon. 2019;5(8):e02192.
32. Bajaj P, Singh NS, Virdi JS. *Escherichia coli* β-lactamases: What really matters. Frontiers in Microbiology. 2016;7:417.
33. Ur Rahman S, Ali T, Ali I, Khan NA, Han B, Gao J. The growing genetic and functional diversity of extended spectrum beta-lactamases. BioMed Research International. 2018;2018:9519718.
34. Lin CF, Hsu SK, Chen CH, Huang JR, Lo HH. Genotypic detection and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a regional hospital in central Taiwan. Journal of Medical Microbiology. 2010;59(Pt 6):665-71.

35. Abrar S, Hussain S ,Khan RA, Ul Ain N, Haider H, Riaz S. Prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: first systematic meta-analysis report from Pakistan. Antimicrobial Resistance and Infection Control. 2018;7:26.
36. 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;62:345-51.
37. 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 and Infection Control. 2018;7:90.
38. Soltan Dallal M, Sabbaghi A, Molla Aghamirzaeie H, Rastegar Lari A, Eshraghian M R, Fallah Mehrabad J, et al. Prevalence of AmpC and SHV β-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* from Tehran hospitals. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013;6(2):176-80.
39. Nabti LZ, Sahli F, Radji N, Mezaghcha W, Semara L, Aberkane S, et al. High prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* in urine samples from inpatients and outpatients at a tertiary care hospital in Sétif, Algeria. Microbial Drug Resistance. 2019;25(3):386-93.
40. Zhu FH, Rodado MP, Asmar BI, Salimnia H, Thomas R, Abdel-Haq N. Risk factors for community acquired urinary tract infections caused by extended spectrum β-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* in children: a case control study. Infectious Diseases. 2019;51(11-12):802-9.
41. 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.
42. Shahbazi S, Asadi Karam MR, 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.
43. Uruén C, Chopo-Escuin G, Tommassen J, Mainar-Jaime RC, Arenas J. Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. Antibiotics. 2021;10(1):3.
44. Davari Abad E, Khameneh A, Vahedi L. Identification phenotypic and genotypic characterization of biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from urinary tract Infections and their antibiotics resistance. BMC Research Notes. 2019;12(1):796.
45. Raeispour M, Ranjbar R. Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of uropathogenic *Escherichia coli* strains. Antimicrobial Resistance Infection Control. 2018;7:118.