

فراوانی بالای میزان جداسازی سویه های اشرشیاکلی مولد عفونت ادراری واجد ژن بیماریزای آنروباکتین

سیده مرجان مجابی (MSc)^۱، رضا رنجبر (PhD)^{۲*}

۱- گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان
۲- مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

دریافت: ۹۳/۱۰/۲، اصلاح: ۹۳/۱۱/۱۵، پذیرش: ۹۴/۱/۲۳

خلاصه

سابقه و هدف: اشرشیاکلی یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده عفونت مجاری ادراری است. این سویه ها انواع مختلفی از فاکتورهای ویروالانس از جمله سیستم های اکتساب آهن را دارا می باشند که انرژی لازم برای انتقال آهن در غشای باکتری را فراهم می نمایند. هدف از این مطالعه بررسی میزان فراوانی ژن بیماریزای آنروباکتین در میان سویه های اشرشیاکلی مولد عفونت ادراری جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان بقیه الله (عج) تهران می باشد.

مواد و روشها: این مطالعه توصیفی بر روی ۵۰ ایزوله اشرشیاکلی مولد عفونت ادراری جدا شده از بیماران در محدوده سنی ۹ ماه تا ۸۷ سال از اردیبهشت تا آبان ماه ۱۳۹۳ انجام شد. باکتری اشرشیاکلی با استفاده از تکنیک های میکروب شناسی و بیوشیمیایی استاندارد شناسایی شد و میزان فراوانی ژن آنروباکتین در ایزوله های جدا شده با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: PCR بطور موفقیت آمیزی توانست باند مورد نظر به اندازه ۶۰۲ جفت باز را ایجاد نماید. وجود این ژن در میان ۴۴ ایزوله (۸۸ درصد) به اثبات رسید.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که فراوانی ژن بیماریزای آنروباکتین در میان سویه های اشرشیاکلی مولد عفونت ادراری بسیار بالا می باشد و لذا یک زنگ خطری برای انتشار بالای این سویه های بیماریزا در بین بیماران جامعه می باشد.

واژه های کلیدی: اشرشیاکلی مولد عفونت ادراری، عفونت مجاری ادراری، رستور آنروباکتین.

مقدمه

زنان بیشتر از مردان می باشد به طوری که تقریباً نیمی از خانم ها حداقل یکبار در طول عمر خود عفونت مجاری ادراری را تجربه کرده اند (۵). اشرشیاکلی ایجاد کننده عفونت مجاری ادراری معمولاً مقاومت بالایی هم به آنتی بیوتیک ها دارند (۶). شدت عفونت مجاری ادراری به دو عامل ویروالانس باکتری و حساسیت میزبان بستگی دارد. اتصال باکتری به سلول های پوششی مجاری ادراری یک مرحله ضروری برای شروع و گسترش عفونت مجاری ادراری است. این فرآیند به باکتری اجازه می دهد تا در مقابل عملکرد شستشوی ادرار و تخلیه مثانه و فعال شدن مسیرهای انتقال پیام در میزبان مقاومت کند. از دیگر خصوصیات اشرشیاکلی برای ایجاد عفونت ادراری سیستم اکتساب آهن است که باکتری به کمک سیدروفور ها آهن را از محیط جذب می کند. ژن آنروباکتین سیدروفور آنروباکتین را کد می کند. بسیاری از باکتری ها برای بدست آوردن آهن مورد نیازشان در بدن میزبان مواد شلاته کننده آهن با وزن مولکولی پایین و افینیتی (فعالیت ذاتی) بالا به نام سیدروفورها را ترشح می کنند که قادر است به شکل رقابتی آهن متصل به پروتئین ها را جذب نماید. سیدروفورها شامل دو گروه

اشرشیاکلی، باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه و مهمترین عضو گروه کلی فرم ها می باشد. اشرشیا کلی جزء فلور نرمال دستگاه گوارش انسان و حیوانات خونگرم محسوب می شود و از نظر شیوع دومین نوع عفونت باکتریایی پس از عفونت مجاری تنفسی است و در بزرگسالان رتبه اول بیماری های عفونی دستگاه ادراری را از نظر مراجعه به پزشک تشکیل می دهد. عفونت مجاری ادراری یکی از شایع ترین عفونت های باکتریایی در انسان است که به طور عمده توسط اشرشیاکلی ایجاد می شود (۱-۳). این باکتری اگرچه معمولاً بی ضرر می باشد، اما عامل ۸۰-۹۰ درصد از عفونت مجاری ادراری اکتسابی از جامعه و ۵۰-۳۰ درصد از عفونت مجاری ادراری، بیمارستانی است. عفونت مجاری ادراری از علل عمده بستری شدن در بیمارستان با عوارض قابل توجه و هزینه های مراقبت بهداشتی است. تشخیص و درمان موثر عفونت مجاری ادراری یک نگرانی بزرگ در زمینه مراقبت های بهداشتی است. در سراسر جهان حدود ۱۵۰ میلیون نفر با عفونت مجاری ادراری تشخیص داده شده اند که هرساله هزینه اقتصادی در این زمینه بیش از ۶ میلیارد دلار در جهان می باشد (۴). فراوانی عفونت مجاری ادراری در

این مقاله حاصل پایان نامه سیده مرجان مجابی کارشناسی ارشد میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر رضا رنجبر

آدرس: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی. تلفن: ۰۲۱-۸۸۰۳۹۸۸۳

Email: ranjbarre@gmail.com

سیرتات مورد آنالیز قرار گرفتند. کشت ادرار زمانی مورد توجه بود که تعداد ۱۰۵ CFU/ml در محیط کشت رشد کرده باشد که نشان دهنده عفونت مجاری ادراری است. ۵۰ نمونه حاوی اشرشیاکلی مولد عفونت ادراری وارد مطالعه گردیدند. جهت انجام امور مولکولی تمامی ایزوله ها در محیط کشت SKIM Milk غنی شده با ۱۵ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره شدند (۱۷).

استخراج DNA سویه های باکتریایی: استخراج DNA باکتری با روش جوشاندن انجام گرفت. بدین صورت که مقداری کلونی از این باکتری برداشته شد و در آب دیونیزه، بن ماری وارد و به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ °C جوشانیده شد و پس از سانتریفیوژ، محلول رویی به عنوان DNA الگو به میکروتیوپ جدید وارد شد و پس از اندازه گیری مقدار DNA استخراج شده به کمک دستگاه نانو دراپ در طول موج های ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر به ترتیب برای میزان جذب DNA و پروتئین ها در تعیین میزان خلوص DNA انجام گردید و سپس نگه داری DNA استخراج شده در ۲۰- درجه سانتی گراد به منظور انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز انجام گردید.

مراحل انجام PCR: طبق بررسی های به عمل آمده و مرور مطالعات انجام شده توسط سایر محققین (۱۹)، جفت پرایمرهای مناسب جهت ردیابی ژن آئروباکتین انتخاب (جدول ۱) و جهت تهیه به شرکت (پیشگام، ایران) سفارش داده شد. تکثیر ژن آئروباکتین با استفاده از تکنیک single-PCR انجام شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام پذیرفت که شامل ۷ میکرولیتر آب مقطر، ۱۰ میکرولیتر Master Mix، ۱ میکرولیتر DNA استخراج شده، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (پیشگام، ایران) است. چرخه های دمایی واکنش زنجیره ای پلیمرز عبارت از ۱ سیکل ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه بمنظور واسرشت اولیه، ۳۵ سیکل شامل، ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه جهت واسرشت کامل، ۵۵ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه جهت اتصال پرایمرها، ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه جهت توسعه پرایمرها، ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه جهت توسعه کامل پرایمرها بودند. تکثیر در یک ترمال سایکلر (Eppendorf Germany) صورت گرفت.

الکتروفورز محصولات PCR: محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ با استفاده از یک سایز مارکر اختصاصی (DNA ladder ۱۰۰۰ bp) الکتروفورز شده سپس ژل ها توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و باند های DNA با استفاده از پرتو UV مشاهده و ارزیابی گردیدند.

اصول اخلاقی: در این مطالعه بیماران دارای عفونت ادراری که برای کمک به انجام این مطالعه داوطلب شده و از نتیجه انجام آزمایشات خود مطلع بودند. همچنین اطلاعات شخصی آنها محرمانه باقی ماند.

جدول ۱. پرایمر مورد استفاده جهت ردیابی ژن آئروباکتین در اشرشیاکلی های یوروتاژن جدا شده از بیماران

سایز محصول (جفت باز)	ترادف پرایمر	ژن هدف
۶۰۲	F: 5'-TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT-3'R	آئروباکتین
	F: 5'-AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG-3'R	

انتروباکتین و آئروباکتین هستند (۷). آهن یک نیاز غذایی مهم برای باکتری ها است به طوری که باکتری ها برای جذب آهن مورد نیاز رشد و تکثیر، در فرآیند تکامل، قابلیت رقابت با فاکتورهای اتصال به آهن میزبان را کسب کرده اند (۸). این توانایی با تولید شلاتورهای قوی آهن به دست آمده و در حال حاضر با نام سیدروفور شناخته می شوند. آهن در فتوسنتز، تنفس، چرخه تری کربوکسیلیک اسید، انتقال اکسیژن، تثبیت نیتروژن، متانوژن، تنظیم بیان ژن و سنتز DNA نقش داشته (۷و۸) و در محلول های آبی به طور ضعیف حل می شود (۹). به طور متوسط هر سلول باکتری برای انجام فرآیندهای زیستی خود به ۱۰۶-۱۰۵ یون آهن احتیاج دارد (۱۰و۱۱). گاهی میزان آهن تا ۱/۸ درصد وزن خشک سلول افزایش می یابد (۱۲). باکتری هایی که در بدن انسان تشکیل کلونی می دهند برای تامین آهن مورد نیاز خود با یک مشکل جدی روبرو هستند و آن داخل سلولی بودن پیش از ۹۹/۹ درصد آهن بدن انسان است که عملاً از دسترس باکتری خارج است. به علاوه این که آهن خارج سلولی که در پلاسما و مایع لنفاوی یافت می شود به شدت در اتصال با ترانسفرین ها هستند (۱۲). باکتری ها برای دسترسی به آهن از مکانیزم های متفاوتی استفاده می کنند. در شرایط هوازی، باکتری ها و قارچ ها انواع لیگاند های آهن فریک با وزن مولکولی کم به نام سیدروفور تولید می کنند (۱۳). تاکنون بیش از ۵۰۰ نوع سیدروفور مختلف از نظر شیمیایی شناسایی شده است (۱۴). برای عبور کمپلکس فریک-سیدروفور از غشای خارجی، باکتری نیاز به انرژی و گیرنده اختصاصی دارد و انرژی به وسیله نیروی محرکه پروتونی غشای سیتوپلاسمی تامین می شود و انتقال آن به غشای خارجی از طریق کمپلکس پروتئینی TonB-ExbB-ExbD صورت می گیرد (۱۵و۱۶). باکتری اشرشیاکلی و چندین گونه دیگر خانواده انتروباکتریاسه در شرایط فقر آهن سیدروفور انتروباکتین ترشح می کنند که به پروتئین غشای خارجی FepA متصل شده و به وسیله آن در فضای پری پلاسمیک آزاد می شود. پروتئین FepB به سیدروفور فریک انتروباکتین متصل و با عبور از فضای پری پلاسمیک آن را به انتقال دهنده ABC موجود در غشای سیتوپلاسمی تحویل می دهد و فعالانه از غشای سیتوپلاسمی عبور می کنند (۱۶). استراتژی اشرشیاکلی برای غلبه بر استرس آهن، تولید سیدروفور انتروباکتین است که به طور کلی به وسیله همه سویه های اشرشیاکلی در شرایط استرس آهن تولید می شود. برای ورود آهن به داخل سلول، پروتئین فریک انتروباکتین (FepA) نقش کلیدی دارد. هدف از این مطالعه بررسی میزان فراوانی ژن بیماریزای آئروباکتین در میان سویه های اشرشیاکلی مولد عفونت ادراری جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان بقیه الله (عج) تهران می باشد.

مواد و روش ها

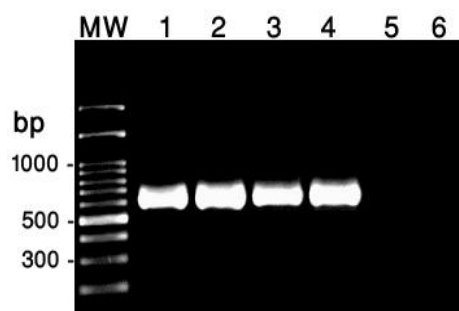
سویه های باکتری: در این مطالعه توصیفی از افراد مشکوک به عفونت دستگاه ادراری که در طی مدت ۶ ماه از اردیبهشت ماه تا آبان ماه ۱۳۹۳ به آزمایشگاه بیمارستان بقیه الله (عج) تهران مراجعه نمودند، خواسته شد که طبق دستورالعمل استاندارد پس از شستشوی اندام تناسلی و خشک کردن، نمونه از اواسط ادرار جمع آوری گردد. سپس به منظور جداسازی اشرشیاکلی، هر یک از نمونه ها به طور مجزا در محیط های کشت مکانیکی، کروم آگار و EMB کشت داده شدند و با تست های بیوشیمیایی استاندارد (IMViC) اندول، متیل رد، وگس پرسکوئر و

یافته ها

PCR بطور موفقیت آمیزی جهت شناسایی این ژن راه اندازی و بهینه سازی شد و توانست باند مورد نظر به اندازه ۶۰۲ جفت باز را ایجاد نماید (شکل ۱). با بررسی نتایج PCR مشخص شد به طور کلی ژن ویبرولانس آئروباکتین در ۸۸٪ ایزوله های مورد بررسی وجود دارد. در بین نمونه های مثبت از نظر وجود ژن آئروباکتین، ۳۲ نفر زن (۶۴٪) و ۱۲ نفر مرد (۲۴٪) بودند. محدوده سنی بیماران از ۹ ماه تا ۸۷ سال متغیر بود میانگین (۲۴۵/۲۶±۸۸). در بین نمونه های مثبت از نظر وجود ژن آئروباکتین ۱۹ نفر (۳۸٪) از بیماران در محدوده سنی زیر ۴۰ سال بودند، در حالی که ۳۱ نفر (۶۲٪) آنها در محدوده سنی ۴۰ سال و بالاتر بودند. ۱۲٪ (۶ نمونه) از سویه های اشرشیاکلی فاقد ژن آئروباکتین و ۸۸٪ (۴۴ نمونه) از سویه های اشرشیاکلی دارای ژن آئروباکتین بودند (جدول ۲).

جدول ۲. توزیع فراوانی بر اساس ایزوله های اشرشیاکلی جدا شده از بیماران
مراجعه کننده با PCR

تاثیر	فراوانی تجمعی نسبی	فراوانی تجمعی ساده	فراوانی نسبی	فراوانی ساده
فاقد ژن	۶	۶	۶/۰	۶
واجد ژن	۴۴	۴۴	۴۴/۰	۴۴



شکل ۱. نتایج PCR بر روی برخی نمونه های بالینی. ردیف های ۱ تا ۴ نمونه های مثبت و جلد ژن آئروباکتین و ردیف های ۵ و ۶ به ترتیب نمونه کنترل منفی و نمونه فاقد ژن آئروباکتین. ردیف MW مارکر مولکولی ۱۰۰۰ جفت بازی می باشد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه بیانگر شیوع بسیار بالای ژن آئروباکتین در بین ایزوله های اشرشیاکلی مولد عفونت ادراری است. مطالعات متعددی نشان داده اند که باکتری اشرشیاکلی عامل بیماری زای غالب جدا شده از نمونه های ادرار است (۱۸ و ۱۹). شیوع عفونت ادراری در نقاط مختلف دنیا متفاوت است (۱۸ و ۱۹). هر چند مطالعه Akoacher و همکارانش در کامرون نشان داد که بین شیوع عفونت ادراری و محل مطالعه ارتباطی دیده نمی شود (۲۰). به طور کلی شیوع عفونت ادراری در مطالعه ما در زنان بیشتر از مردان است که این می تواند به خاطر تفاوت در آناتومی مجاری ادراری، به دلیل رفتار های بهداشتی، تاثیر عامل ژنتیک و عامل میکروبیولوژی آنها باشد. این نتیجه در مطالعات دیگر نیز دیده شده است (۲۱ و ۲۲). عفونت مجاری ادراری به عنوان یک عامل خطرزا در زنان جوان بعد از

منوپوز گزارش شده است. بی شک چندی از دلایل افزایش عفونت در زنان جوان شامل داشتن سابقه عفونت مجاری ادراری اخیر، نگه داشتن ادرار در طول روز و به تاخیر انداختن تخلیه مثانه، مصرف کم مایعات، نحوه شستشو بعد از دفع ادرار، شستشو و تخلیه مثانه بعد از نزدیکی، جنس لباس زیر و افزایش تعداد مقاربت در هفته می باشد. میانگین محدوده سنی در جمعیت مورد مطالعه ما بالا بود که ممکن است دلیل این امر بخاطر بالاتر بودن فراوانی ریز فاکتور های عفونت ادراری در افراد مسن از جمله ضعف سیستم ایمنی، انسداد مجاری ادراری، دیابت شیرین، بزرگی پروستات و تخلیه ضعیف مثانه باشد (۲۳ و ۲۴). از طرف دیگر علاوه بر وجود بیماری های زمینه ای، استفاده از کاتتر و عدم رعایت موازین بهداشتی توسط بیمار هم می تواند یک ریسک فاکتور مهم در ایجاد عفونت ادراری باشد. Kudinha و همکارانش با روش Single-PCR در ۸۷٪ نمونه های ادرار افراد مبتلا به عفونت ادراری ژن آئروباکتین را شناسایی کردند (۲۵). همچنین مطالعه Oliveira و همکارانش نشان داد که ۸۸٪ ایزوله های اشرشیاکلی جدا شده از نمونه های ادراری دارای ژن آئروباکتین می باشند که کاملاً با یافته های ما مطابقت داشت (۲۶).

این نتایج همچنین با نتیجه ارائه شده توسط Johnson و همکارانش مطابقت دارد (۲۷). مطالعه Montaz و همکاران و نیز Soto و همکارانش نشان می دهد که باکتری اشرشیاکلی، عامل بیماریزا غالب جدا شده از نمونه های ادرار است (۱ و ۲۸). فراوانی این ژن در مطالعات ایشان نزدیک به آمار ما بود. این یافته ها نشان می دهد که ژن آئروباکتین یک فاکتور مهم و شایع در سویه های اشرشیاکلی مولد عفونت ادراری است و به دلیل عملکرد اختصاصی اش می تواند به عنوان هدف در مداخلات درمانی مدنظر قرار بگیرد. آئروباکتین نوعی سیستم اکتساب آهن است که باعث فراهم کردن آهن برای باکتری در محیط های فقیر از آهن هم چون مجاری ادراری می شود، به همین خاطر نوعی مکانیسم دفاعی برای باکتری محسوب می شود (۲۹).

همچنین در مطالعه Mercon و همکاران بر روی بیماران پیوند کلیوی، شیوع ژن آئروباکتین ۸۸٪ گزارش شده است. در مطالعه انجام شده توسط Santo و همکاران شیوع این ژن ۸۶٪ گزارش شد که این نتایج نیز مشابه نتایج به دست آمده از مطالعه ما است (۳۰ و ۳۱). نتیجه مطالعه حاضر نشان داد که فراوانی ژن بیماریزای آئروباکتین در میان سویه های اشرشیاکلی مولد عفونت ادراری مراجعه کننده به بیمارستان مورد بررسی بسیار بالا می باشد و لذا یک زنگ خطری برای انتشار بالای این سویه های بیماریزا در بین بیماران در جامعه می باشد. از این رو در جامعه ضرورت انجام این تحقیق و تحقیقات دوره ای مشابه، امری اجتناب ناپذیر است. امید است که یافته های این بررسی بتواند در برنامه ریزی غربالگری، پیش گیری و اقدامات درمانی عفونت ادراری مورد استفاده قرار گرفته و موجب کاهش هزینه های بهداشتی درمانی گردد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاران شاغل در آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، آقای داریوش قاسمی و خانم فاطمه پورعلی که در پیش برد این تحقیق همکاری ارزنده و سودمند داشتند، تقدیر و تشکر می گردد.

The Frequency of Escherichia coli Strain Isolates Causing Urinary Tract Infections in the presence of Pathogenic Aerobactin Genes

S.M. Mojabi (MSc)¹, R. Ranjbar (PhD)^{*2}

1.Department of Microbiology, Islamic Azad University, DamghanBranch, Damghan, I.R.Iran

2.Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 17(5); May 2015; PP: 31-36

Received: Dec 23th 2015, Revised: Feb 4th 2015, Accepted: Apr 12th 2015.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Escherichia-coli is one of the major causes of urinary tract infection (UTI). The strains of this bacterium have a variety of virulence factors, such as iron acquisition systems, that provide the energy for iron transport in bacterial membranes. This study aimed to determine the frequency of pathogenic Aerobactin genes among the UTI-causing strains of E. coli isolated from patients referring to Baghiatallah Hospital in Tehran, Iran.

METHODS: This study was conducted on 50 isolates of E. coli provided from UTI patients within the age range of 9 months to 87 years from May 2014 to November 2014. E. coli strains were identified via standardized microbiology and biochemical lab techniques, and the frequency of Aerobactin genes in the isolates of the bacterium were measured via the polymerase chain reaction (PCR) method.

FINDINGS: In this study, PCR was successfully able to create the proper band size of 602 bp, and the presence of aerobactin was confirmed in 44 isolates of E. coli (88%).

CONCLUSION: According to the results of this study, the frequency of virulent aerobactin genes among the UTI-causing strains of E. coli was considerably high, which is an alarming signal of the prevalence of virulent strains among different patients.

KEY WORDS: *Escherichia Coli, Urinary Tract Infections, Aerobactin Receptor.*

Please cite this article as follows:

Mojabi SM, Ranjbar R. The Frequency of Escherichia coli Strain Isolates Causing Urinary Tract Infections in the presence of Pathogenic Aerobactin Genes. J Babol Univ Med Sci. 2015;17(5):31-6.

*Corresponding Author: R. Ranjbar (PhD)

Address: Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

Tel: +98 21 88039883

Email: ranjbarre@gmail.com

References

- 1.Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpour Dehkordi F, Ranjbar R, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2013; 29;12:8.
- 2.Farshad S, Ranjbar R, Japoni A, Hosseini M, Anvarinejad M, Mohammadzadegan R. Microbial susceptibility, virulence factors, and plasmid profiles of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children in Jahrom, Iran. *Arch Iran Med*. 2012 ;15(5):312-6.
- 3.3.Ranjbar R, Haghi-Ashtiani MT, Jonaidi Jafari N, Abedini M. The prevalence and antimicrobial susceptibility of bacterial uropathogens isolated from pediatric patients. *Iran J Pub Health*. 2009;38(2):134-8.
- 4.Zhao L, Gao S, Huan H, Xu X, Zhu X, Yang W, et al. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. *Microbiology*. 2009;155(5):1634-44.
- 5.Anvarinejad M, Farshad S, Alborzi A, Ranjbar R, Giammanco GM, Japoni A. Integron and genotype patterns of quinolones-resistant uropathogenic *Escherichia coli*. *African J Microbiol Res*. 2011;5(22):3736-70.
- 6.Saha S, Nayak S, Bhattacharyya I, Saha S, Mandal AK, Chakraborty S, et al. Understanding the patterns of antibiotic susceptibility of bacteria causing urinary tract infection in West Bengal, India. *Front Microbiol*. 2014;5(Article 463):1-7.
- 7.Ratledge C, Dover LG. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual reviews in microbiology*. 2000;54(1):881-941.
- 8.Crichton R, Boelaert JR. Inorganic biochemistry of iron metabolism: from molecular mechanisms to clinical consequences. 2nd ed. John Wiley & Sons. 2001. p.120-22
- 9.Shouldice SR, Dougan DR, Williams PA, Skene RJ, Snell G, Scheibe D, et al. Crystal structure of *Pasteurella haemolytica* ferric ion-binding protein A reveals a novel class of bacterial iron-binding proteins. *J Biol Chem*. 2003;278(42):41093-8.
- 10.Annamalai R, Jin B, Cao Z, Newton SM, Klebba PE. Recognition of ferric catecholates by FepA. *J Bacteriol*. 2004; 186(11): 3578-89.
- 11.Smith AW. 6.13 Iron starvation and siderophore-mediated iron transport. *Method Microbiol*.1998;27:331-42.
12. Larrie Baghal SM, Mousavi Gargari SL, Rasooli I. Antibody production against enterobacteriaceae using recombinant Ferric Enterobactin protein (FepA). *Modares J Med Sci: Pathobiol*.2009;12(2):83-92. [In Persian]
13. Crosa JH, Mey AR, Payne SM. *Ron transport bacteria*. Washangton DC:Am Society for Microbiology(ASM)Press.2004.
14. Heymann P, Ernst JF, Winkelmann G. Identification of a fungal triacetylufusarinine C siderophore transport gene (TAF1) in *Saccharomyces cerevisiae* as a member of the major facilitator superfamily. *Biometals*. 1999;12(4):301-6.
- 15.Drechsel H, Winkelmann G. Transition metals in microbial metabolism: 1. Iron chelation and siderophores. *CRC Press*.1997.p.1.
16. Faraldo-Gómez JD. Protein-mediated siderophore uptake in gram-negative bacteria: A structural perspective. *Microb Siderophores:Soil Biol*. 2007;12:105-20.
17. Amiri FN, Rooshan MH, Ahmady MH, Soliamani MS. Hygiene practices and sexual activity associated with urinary tract infection in pregnant women. *East Mediterr Health J*. 2009;15(1):104-10.
18. Assob JC, Kanga HL, Nsagha DS, Njunda AL, Nde PF, Asongalem EA, et al. Antimicrobial and toxicological activities of five medicinal plant species from Cameroon Traditional Medicine. *BMC Complement Altern Med*. 2011;11(1):70.
19. Tham J, Odenholt I, Walder M, Brolund A, Ahl J, Melander E. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in patients with travellers' diarrhoea. *Scand J Infect Dis*. 2010;42(4):275-80.

20. 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.
21. Jadhav S, Hussain A, Devi S, Kumar A, Parveen S, Gandham N, et al. Virulence characteristics and genetic affinities of multiple drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* from a semi urban locality in India. PLoS One. 2011;6(3):e18063.
22. Brumbaugh AR, Mobley HL. Preventing urinary tract infection: progress toward an effective *Escherichia coli* vaccine. Expert Rev Vaccines. 2012;11(6):663-76.
23. Agarwal J, Srivastava S, Singh M. Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*. Indian J Med Microbiol. 2012;30(2):141-9.
24. Sharma AR, Bhatta DR, Shrestha J, Banjara MR. Antimicrobial susceptibility pattern of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infected patients attending bir hospital. Nepal J Sci Technol. 2013;14(1):177-84.
25. Kudinha T, Kong F, Johnson JR, Andrew SD, Anderson P, Gilbert GL. Multiplex PCR-based reverse line blot assay for simultaneous detection of 22 virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 2012;78(4):1198-202.
26. Oliveria FA, Paludo KS, Arend LN, Farah SM, Pedrosa SO, Souza EM, et al. Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. Genet Mol Res 2011;10(4):4114-25
27. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clin Microbiol Rev. 1991;4(1):80-128.
28. Soto SM, Guiral E, Bosch J, Vila J. Prevalence of the *set-1B* and *astA* genes encoding enterotoxins in uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolates. Microb Pathog. 2009;47(6):305-7.
29. Qin X, Hu F, Wu S, Ye X, Zhu D, Zhang Y, et al. Comparison of adhesin genes and antimicrobial susceptibilities between uropathogenic and intestinal commensal *Escherichia coli* strains. PloS One. 2013;8(4):e61169.
30. Mercon M, Regua-Mangia AH, Teixeira LM, Irino K, Tuboi SH, Goncalves RT, et al. Urinary tract infection in renal transplant recipients; virulence trains of uropathogenic *Escheria coli*. Transplantat Proc. 2010;42(2):483-5.
31. Santo E, Macedo C, Marin JM. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a university hospital in Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2006;48(4):185-8.