

توزیع فراوانی ژنهای کد کننده فیمبریه در *E. coli* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری

چکیده

زمینه و هدف: توانایی اتصال به سطوح میزبانی جزء اساسی ترین مراحل در کلونیزاسیون موفق پاتوژنهای میکروبی می باشد. سویه های *E. coli* ایجاد کننده عفونت دستگاه ادراری دارای تعداد زیادی فیمبریه مثل فیمبریه نوع *Pil*-*P*، فیمبریه *S*، فیمبریه *FIC*، فیمبریه *Dr*، فیمبریه و ادهسین های افیمبريال می باشند. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی ژن های کد کننده فیمبریه ها در اشرشیا کلی مولد عفونت ادراری در تهران انجام شده است.

روش بررسی: در این تحقیق 363 نمونه ادراری از افراد مبتلا به عفونت دستگاه ادراری در طی سالهای 87-89 از آزمایشگاههای بالینی غرب تهران جمع آوری شد. با استفاده از روشهای بیوشیمیایی استاندارد *E. coli* بودن 200 نمونه تایید گردید. پس از استخراج *DNA* از نمونه ها به روش *Boiling*، حضور ژنهای فیمبریا *afa*، *foc*، *pap*، *sfa*، *fim* به روش *PCR* مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: میزان شیوع ژنهای فیمبریه *fim*، *sfa*، *afa*، *foc*، *pap* در بین 200 سویه به ترتیب 188 (94%)، 34 (17%)، 20 (10%)، 62 (31%)، 71 (35.5%) تعیین گردید.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که ژن *fim* و *pap* شایعترین ژنهای کد کننده فیمبریه در اشرشیا کلی های جدا شده از عفونت ادراری در شهر تهران می باشد. این مسئله می تواند اطلاعاتی در رابطه با اهمیت آنها در آسیب شناسی عفونت ادراری، مدیریت *UTI* و راهکارهای درمانی همانند تولید واکسن های نوین فراهم آورد.

واژه های کلیدی: عفونت ادراری، فیمبریه، اشرشیا کلی

علی ناظمی

استادیار، گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

مهسا نادری

کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

مصطفی جعفرپور

استادیار، گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

میرساعد میری نرگسی

استادیار، گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

شهر آشوب شریفی

کارشناسی ارشد بیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آنکارا، ترکیه

نویسنده مسئول: علی ناظمی

تلفن: 09126051565

پست الکترونیک: alinazemy@yahoo.com

آدرس: مازندران، تنکابن، ولی آباد، مجتمع آموزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، گروه بیولوژی

وصول مقاله: 90/2/26

اصلاح نهایی: 90/5/15

پذیرش مقاله: 90/5/23

مقدمه

E.coli جزء فلور نرمال دستگاه گوارش انسان و حیوانات خونگرم محسوب می شود (1 و 2). این باکتری ها اگرچه معمولاً بی ضرر می باشند، چندین سویه از *E.coli* عوامل ژنتیکی (ژنهای ویرولانسی) را به دست آورده اند که به آنها خاصیت بیماریزایی برای انسان و حیوان می بخشد (3 و 4). این پاتوژنها مسئول ایجاد چند نوع عفونت بالینی مثل بیماریهای انتریک و اسهالی، عفونتهای دستگاه ادراری، سپسیس و مننژیت. براساس خصوصیات بیماریزایی هر کدام از آنها و علائم بالینی میزبان، سویه های بیماریزای *E.coli* به چندین گروه یا پاتوتایپ تقسیم می شوند (5).

عفونتهای Extraintestinal (خارج روده ای) به وسیله سه پاتوتایپ مجزا از *E.coli* ایجاد می شوند: 1) سویه های *E.coli* (uropathogenic *E.coli*) که عفونت های دستگاه ادراری را در انسان، سگ و گربه ایجاد می کند (3 و 6)، 2) سویه های مسئول در ایجاد مننژیت نوزادی (MENEC) (3 و 7)، 3) سویه هایی که سپتی سمی را در انسان و حیوان ایجاد می کنند (8 و 9).

UPEC عامل اولیه عفونت دستگاه ادراری (UTI) در کشورهای توسعه یافته است (6 و 9 و 10 و 11). UTI جزء رایجترین بیماریهای عفونی انسان محسوب می شود (12). در ایالات متحده آمریکا (USA) هر ساله 1/6 میلیون دلار هزینه صرف درمان این عفونت ها می گردد. تخمین زده می شود که 40-50% از زنان سالم بالغ در طول دوره زندگی خود حداقل یکبار UTI را تجربه می کنند (13). این بیماری عفونی معمولاً با عفونت مثانه شروع می شود اما اغلب با فرا گرفتن کلیه ها توسعه پیدا می کند و سرانجام ممکن است منجر به نارسایی کلیوی شود و حتی به خون هم راه یابد (11).

توانایی UPEC برای ایجاد عفونت علائم دار دستگاه ادراری به دلیل وجود دو نوع عامل ویرولانسی می باشد: ادهسین ها (مثل فیمبریه نوع I، P-فیمبریه، S-فیمبریه، FIC-فیمبریه و...) و توکسین ها (مثل همولیزین، فاکتور نکروز دهنده تومور) (11 و 14 و 15).

اتصال به اپی تلیوم دستگاه ادراری اولین مرحله UTI می باشد و این باعث می شود تا باکتری نسبت به نیروهای هیدرودینامیک جریان ادرار مقاوم باشد (5) و این موضوع باعث افزایش یافتن توانایی آنها برای تکثیر و تهاجم به بافت کلیوی می گردد (12 و 14).

UPEC دارای فاکتورهای اتصالیه هستند به نام پیلی یا فیمبریه، که به آنها اجازه می دهد تا به طور موفقیت آمیزی عفونت را آغاز کنند (12). ادهسین ها آنتی ژنهای فیمبریالی هستند که باکتری را قادر می سازند تا به موکوس روده متصل شود (16). از ادهسین های معمول موجود در UPEC می توان به P فیمبریا، فیمبریا نوع 1، S فیمبریا، FIC فیمبریا و خانواده ادهسین Dr (17) که شامل ادهسین Dr و ادهسین های افیمبریا می باشد، نام برد (18). این فیمبریاها، به ترتیب، توسط ژنهای *afa*, *foc*, *sfa*, *fim*, *pap* کد می شوند (19). در UPEC، فیمبریا نوع 1 مهمترین عامل حدت است. تعدادی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه این ژن را تولید می کنند. فیمبریه نوع 1 به وسیله بیش از 90% سویه های *E.coli* بیان می شود. این فیمبریه اتصال به گلیکوپروتئین های ترشح شده و گلیکوپروتئین های مانوزیله شده ای را که به سلول متصل شده اند وساطت می کند. P-فیمبریه؛ ضمامم هتروپلی مریک سخت میله ماندی هستند که از سطح سلول *E.coli* بیرون زده اند و نشان داده شده است که در بیشتر از 70% اشرشیاکلی پیلونفریتوزنیک حضور دارد (20). FIC فیمبریه به وسیله کلاستر ژن *foc* کد می شود، یک فاکتور اتصالیه غیر همگلوئینه کننده است که به وسیله تقریباً 14% از *E.coli* ایجاد کننده عفونت دستگاه ادراری و 7% از سویه های مدفوعی *E.coli* بیان می شود. این فیمبریه از نظر ژنتیکی مشابه S فیمبریه است اما از نظر اختصاصیت رسپتورها شان با یکدیگر متفاوتند (21). S-فیمبریه به رسپتورهای حاوی بخش های قندی اسید سیالیک متصل می شود و در *E.coli* ایجاد کننده سیستیس و پیلونفریت حضور دارد (17). افیمبریا ادهسین ها، از نظر خصوصیات مورفولوژی و بیوشیمیایی با دیگر

مربوط به ژن *pap* بود که با توجه به واریانت های مختلفی که ناحیه ادهسینی این ژن دارا می باشد (17)، برای ناحیه مربوط به Usher همین ژن طراحی شد. در هر واکنش single-PCR روی نمونه های مورد نظر به همراه کنترل مثبت و منفی اجراء شد. آنزیم ها و مواد شیمیایی مورد نیاز توسط شرکت سینازن فراهم گردید. تکثیر در یک ترمال سایکلر (Eppendorf, Germany) بر طبق روش ارائه شده در جدول 2 صورت گرفت. سایز قطعات تکثیر شده مورد نظر با الکتروفورز در ژل آگارز 2% با استفاده از یک سایز مارکر اختصاصی (100 bp DNA ladder, MBI, Fermentas, Lithuania) مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها

پس از تست های بیوشیمیایی بر روی تمامی 363 نمونه ادراری، مشخص گردید که 200 نمونه حاوی *E. coli* می باشند. سپس با انجام واکنش PCR بر روی DNA های استخراج شده از این نمونه ها، مشخص گردید که 188 سویه (94%) *fim*⁺، 62 (31%) *sfa*⁺، 34 (17%) *foc*⁺، 20 (10%) *afa*⁺ بودند. به طور جالب توجهی مشخص شد که تنها 1/5% از نمونه های مورد بررسی فاقد هر گونه ادهسین روی سطح خود هستند. از طرفی مشخص شد که از بین 200 نمونه، 188 نمونه از نظر حضور ژن *fim* مثبت می باشند که در این بین 96 سویه تنها دارای ژن *fim* و مابقی علاوه بر این ژن دارای حداقل یکی از ژنهای *pap*, *sfa*, *foc*، *afa* هستند. در این مطالعه مشخص شد که ژن *sfa* در 62 نمونه (31%) وجود دارد. از بین 62 نمونه مثبت، 28 (14%) به طور همزمان دارای اپران *pap* و *sfa* و 31 (5/15%) دارای اپران *sfa* و *afa* می باشند. نتیجه این مطالعه نشان داد که در بین سویه های مورد بررسی شیوع ژن *fim* بیشترین درصد آماری را به خود اختصاص داده است و در باقی سویه ها که فاقد این ژن می باشند، شیوع ژن *sfa* نسبت به دیگر ژن ها بالاتر است. به منظور تأیید صحت تکثیر ژنها، محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت MacroGene کره جنوبی ارسال گردید. پس از ردیف سازی توالی مربوط در nBlast سایت NCBI، صحت قطعه مورد نظر تأیید گردید.

ادهسین ها تفاوت دارند و توسط ژن *afa* کد می گردند و نشان داده شده است که در ایجاد عفونت دستگاه ادراری دارای نقش می باشند (11).

با توجه به شیوع عفونت ادراری در جامعه، ضرورت انجام غربالگری، تشخیص و درمان به موقع بیماران از اهمیت بالایی برخوردار می باشد. به این دلیل که با سهل انگاری در درمان این عفونت، مشکلات جبران ناپذیری در آینده برای بیمار و خانواده او رخ خواهد داد. بنابراین تحقیق حاضر با هدف بررسی میزان شیوع ژنهای فیمبریا، که جزء عوامل اولیه برای اتصال باکتری در دستگاه ادراری و ایجاد عفونت دستگاه ادراری (UTI) می باشند، صورت پذیرفته است. با دانستن میزان شیوع این ژنها در جامعه و با توجه به نقش مهم و ضروری آنها در ایجاد عفونت می توان به فکر طراحی واکسن هایی علیه این فیمبریه در باکتری UPEC افتاد.

روش بررسی

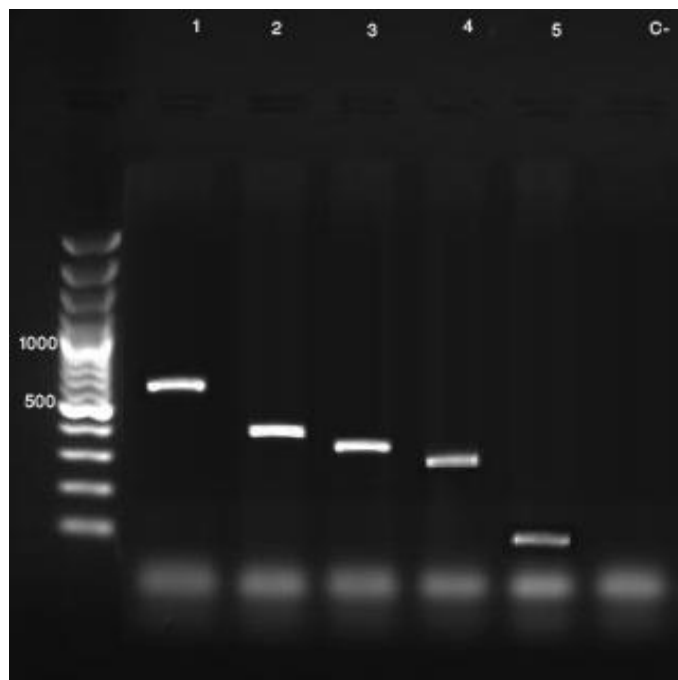
از 363 فرد مشکوک به عفونت دستگاه ادراری که در طی سالهای 89-1387 به چندین آزمایشگاه واقع در غرب تهران مراجعه نموده بودند، خواسته شد که طبق دستور العمل استاندارد پس از شستشوی اندام تناسلی و خشک کردن، نمونه جمع آوری گردد. سپس به منظور جداسازی *E. coli*، هر کدام از نمونه ها به طور مجزا در محیط های کشت مکانکی، بلاد آگار و EMB کشت داده شدند و با تست های بیوشیمیایی استاندارد مورد آنالیز قرار گرفتند. کشت ادرار زمانی مورد توجه بود که تعداد 10^5 cfu/ml در محیط کشت رشد کرده باشد (22). پس از انجام این کار مشخص گردید که 200 نمونه حاوی باکتری *E. coli* می باشد. سپس DNA این باکتری ها با استفاده از روش *Boiling* استخراج گردید، بدین صورت که مقداری کلونی از این باکتری برداشته شد و در آب دیونیزه وارد و به مدت 5 دقیقه در 95°C جوشانیده شد و پس از سانتریفوژ، محلول رویی به عنوان DNA الگو در 20°C - سانتی گراد به منظور انجام واکنش PCR نگهداری شد. آشکار سازی ژن های *afa*, *foc*, *sfa*, *pap*, *fim* با استفاده از تکنیک single-PCR انجام شد. پرایمرهای مورد نیاز، برای ناحیه ادهسینی این ژنها طراحی گردید. تنها مورد استثنا پرایمر

جدول 1. توالی پرایمرهای ژنهای مورد نظر در اشرشیا کلی های جدا شده از عفونت ادراری در تهران

ژن	توالی پرایمر (3' به 5')	طول قطعه تکثیر شده (bp)	رفرنس
<i>Fim</i>	GTT GTT CTG TCG GCT CTG TC TAA ATG TCG CAC CAT CCA G	400	این مطالعه
<i>Sfa</i>	CCG TAA AGA TGT CTG CGA G AGC AAG TCT GGC AAC GAG	100	این مطالعه
<i>Afa</i>	GCT GGG CAG CAA ACT GAT AAC TCT C CAT CAA GCT GTT TGT TCG TCC GCC G	750	15
<i>Foc</i>	GGT GGA ACC GCA GAA AAT AC GAA CTG TTG GGG AAA GAG TG	388	23
<i>pap</i>	GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A	328	15

جدول 2. مقدار مواد مورد استفاده برای PCR ژنهای مورد نظر در اشرشیا کلی های جدا شده از عفونت ادراری در تهران

Genes	template DNA(μl)	MgCl ₂ (mM)	each of the four dNTPs(mM)	DMSO	Total volume	Primer(pmol)
<i>fim</i>	3	2	0.4	-	25	10
<i>sfa</i>	3	2	0.4	-	25	10
<i>afa</i>	3	2.3	0.2	-	25	20
<i>foc</i>	5	2	0.2	5%	30	100
<i>pap</i>	1	1.5	0.2	-	25	20



تصویر 1. نتیجه تکثیر ژنهای مورد بررسی. خطوط 1 تا 5 به ترتیب مربوط به ژنهای *afa*، *fim*، *foc*، *pap*، *sfa* می باشند و تصویر سمت چپ سایز مارکر 100 جفت بازی را نشان می دهد.

جدول 3. نتایج حضور ژنهای *fim*، *foc*، *pap*، *sfa*، *afa* از طریق PCR در اشرشیا کلی های جدا شده از عفونت ادرار در شهر تهران

Virulence factor gene	Number of positive isolates(%)
<i>fim</i>	188(94%)
<i>sfa</i>	62(31%)
<i>afa</i>	20(10%)
<i>foc</i>	34(17%)
<i>pap</i>	71(35.5%)

بحث

اشرشیا کلی به عنوان یک عامل ایجاد کننده عفونت دستگاه ادراری در انسان محسوب می شود. در اکثر موارد کلونهای یوروپاتوژنیک در مدفوع وجود دارند و تصور می گردد که توانایی بالقوه برای پاتوژنیک بودن سویه های *E. coli*، وابسته به حضور فاکتورهای ویروالانس باشد (19 و 24 و 25). دانشمندان بر این باورند که اولین مرحله در ایجاد عفونت دستگاه ادراری، اتصال باکتری به یورواپیتلیوم می باشد. در موارد زیادی نشان داده شد که فیمبریه واسطه این اتصال است (13). از ادهسین های معمول موجود در UPEC میتوان به P فیمبریا، فیمبریا نوع 1، S فیمبریا، FIC فیمبریا و خانواده ادهسین Dr که شامل ادهسین Dr و ادهسین های افیمبریال میباشد، نام برد (19). در مطالعه حاضر ما از یک روش ژنوتیپی برای مطالعه حضور ژنهای ویروالانس *E. coli* یوروپاتوژنیک استفاده کردیم. PCR یک روش ژنوتیپی خیلی اختصاصی، قدرتمند و موثر می باشد که برای آشکار سازی اپرانهای کد کننده ادهسین و دیگر فاکتورهای ویروالانسی که می توانند روی ویروالانس UTI اثر بگذارند، استفاده می شود.

ما در این مطالعه دریافتیم که شیوع ژنهای ویروالانس فیمبریا *fim*, *pap*, *sfa*, *afa*, *foc* به ترتیب، 94%، 35/5%، 31%، 26/5%، 17% می باشد. این یافته ها با نتایج به دست آمده از ریبیو و همکارانش در سال 2008 مطابقت دارد. آنها عنوان کردند که شیوع ژنهای *fim*, *pap*, *sfa*, *afa* در بین 162 نمونه، به ترتیب 97/5%، 32/7%، 27/8%، 6/2% می باشد. در مطالعه ای که توسط لان و همکارانش در سال 2007 در دانشگاه میشیگان انجام شد، مشخص گردید که فیمبریه نوع I به مقدار زیادی در طول عفونت دستگاه ادراری بیان می گردد که این بیان می تواند منجر به کاهش حرکت در این باکتری گردد و این موضوع به عنوان یک عامل مهم در عفونت، بویژه در 24 ساعت از زمان کلونیزاسیون در مثانه، تلقی می گردد (25). بعلاوه ما مشاهده کردیم که 90 سویه *fimH* مثبت، دارای حداقل یکی از ژنهای *pap*, *sfa*, *foc*, *afa* می باشند. این نتیجه با نتیجه ارائه شده توسط جانسون و همکارانش در سال 2005 مطابقت دارد (26). آنها عنوان کرده بودند که *fimH* در ارتباط

با P-فیمبریه و S-فیمبریه می باشد. آریسوی 161 سویه *E. coli* را که از کودکان مبتلا به UTI جدا کرد و دریافت که 58/4% از سویه ها حداقل دارای یکی از ژنهای ویروالانس می باشند: مشخص شد که شیوع ژنهای *pap*, *cnf-1*, *sfa*, *hly* به ترتیب برابر است با 22/98%، 9/94%، 6/21%، 1/24% و با توجه به این موضوع که شیوع ژن *pap* در بین سویه های *E. coli* ایجاد کننده سیستمس پایین می باشد در نتیجه اکثر افراد مورد مطالعه در این تحقیق مبتلا به سیستمس بوده اند (7).

این مطالعه اهمیت وجود این ژنها را در سویه های UPEC نشان می دهد. با دانستن نقش مهم و کلیدی این ژنها در ویروالانس سویه های ایجاد کننده دستگاه ادراری و با وجود هزینه های زیادی که هر ساله برای درمان UTI بر جامعه و خانواده تحمیل می شود می توانیم به فکر طراحی واکسن علیه این بیماری باشیم. در این تحقیق بطور همزمان حضور 5 ژن فیمبریه مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که اولین مرحله برای ایجاد عفونت اتصال باکتری می باشد و فیمبریه نقش مهم و کلیدی را برای اتصال فراهم می کند در نتیجه اهمیت و ضرورت انجام این تحقیق مشخص می شود. در این مطالعه مشخص گردید که ژن *fim* و *sfa* در بین افراد مورد مطالعه بیشترین درصد آماری را به خود اختصاص می دهند و این موضوع می تواند به عنوان یک نقطه عطفی باشد تا در مطالعات بعدی به فکر طراحی واکسن ترکیبی علیه این دو فیمبریه باشیم تا بدین طریق بتوانیم از ایجاد این عفونت در جامعه پیشگیری کنیم. برای دستیابی به اطلاعات جامع و ارزیابی دقیقتر پیشنهاد می شود که در تحقیقات دیگر حضور دیگر عوامل ویروالانس مثل توکسین ها، سیستم های جمع کننده آهن و ... نیز همراه با فیمبریه مورد بررسی قرار بگیرد تا بتوان مقایسه ای بین این فاکتورها انجام داد اما با توجه به این موضوع که اتصال اولین مرحله برای ایجاد عفونت می باشد ما در تحقیق خود به طور کامل حضور ژنهای دخیل در اتصال را مورد بررسی قرار دادیم.

References

- 1-West DM, Sprigings KA, Cassar C, Wakeley PR, Sawyer J, and Davies RH. *Rapid detection of Escherichia coli virulence factor gene using multiplex real-time TaqMan1 PCR assays.* Vet Microbiol. 2007; 122: 323–33
- 2-Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, Elion J, and Denamur E. *The Link between phylogeny and virulence in Escherichia coli extraintestinal infection.* Infect Immun. 2009 ; 546–553
- 3-Bekal S, Brousseau R, Masson L, Prefontaine G, Fairbrother J, and Harel J. *Rapid identification of Escherichia coli pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays.* J Clin Microbiol. 2003; 2113–2125
- 4-Ulett G, Mabbett A, Fung Kh, Webb R, and Schembri M. *The role of F9 fimbriae of uropathogenic Escherichia coli in biofilm formation.* J Microbiol. 2007 ; 2321-2331
- 5-Schwan W, Lee J, Lenard F, Matthews B, and Beck M. *Osmolarity and pH growth conditions regulate fim gene transcription and Type 1 pilus expression in uropathogenic Escherichia coli.* Infect Immun. 2002 ; 1391–1402
- 6-Welch RA, Burland V, Plunkett G, Redford P, Roesch P, Rasko D, et al. *Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic Escherichia coli.* Pans. 2002; 17020-17024.
- 7-Arisoy M, Aysev D, Ekim M, et al. *Detection of virulence factor of Escherichia coli from children by multiplex polymerase chain reaction.* J Clin Pract. 2006; 60:170-3
- 8-Ghanbarpour R, and Salehi M. *Determination of adhesin encoding genes in Escherichia coli isolates from omphalitis of chick.* J Vet Sci. 2010; 5(2): 84-89
- 9-Raksha R, Srinivasa H, and Macaden RS. *Occurrence and characterization of uropathogenic Escherichia coli urinary tract infections.* Indian J Med Microbiol. 2003; 21 (2): 102- 107.
- 10-Matiuzzi da Costa M, Drescher G, Maboni F, Weber Sh, de Avila Botton S, Henning Vainstein M, Schrank IS, and Castagna de Vargas A. *Virulence factors and antimicrobial resistance of Escherichia coli isolated from urinary tract of swine in southern of Brazil.* Brazilian J Microbiol. 2008 ; 39:741-743.
- 11-Sorsa J. *Characterization of genomic diversity in extraintestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC) and development of a diagnostic DNA microarray for the differentiation of ExPEC isolates causing urinary tract infections.* Acad Disser Gene Microbiol. 2007 ;1-16.
- 12-Santo E, Macedo C, and Marin JM. *Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli from a university hospital in ribeirão preto, sao paulo, brazil.* Inst Med Trop Sao Paulo. 2006; 48(4):185-188.
- 13-Snyder J, Haugen B, Lockett CV, Maroncle N, Hagan E, Johnson D, Welch R, and Mobley H. *Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic Escherichia coli.* Infect Immun. 2005 ;7588–7596
- 14-Alex P, Stouracova K, Hamric J, and Rychlik I. *Gene typing of the colonization K88(F4) in enterotoxigenic E.coli strains isolated from diarrhoeic piglets.* Vet Med- Czech .2001 ; 46-49.
- 15-Birosova E, Siegfried L, Kmetova M, Makara A, Ostro A, Gresova A, et al. *Detection of virulence factors in a-haemolytic Escherichia coli strains isolated from various clinical materials.* Clin Microbiol Infect. 2004;10: 569–573.
- 16-Blanco M, Leonel L, Blanco J, Dahbi Gh, Mora A, Cecilia L, González E, and Blanco J. *Serotypes, virulence genes, and PFGE patterns of enteropathogenic Escherichia coli isolated from Cuban pigs with diarrhea.* Int Microbiol. 2006; 9:53-60
- 17-Mulvey M. *Adhesion and entry of uropathogenic Escherichia coli.* Cell Microbiol. 2002; 4(5): 257–271.
- 18-Riberio M, Yano Tand Silva Leite D. *Genotypic characterization of virulence factors in Escherichia coli strains from patients with cystitis.* Inst Med trop Sao Paulo. 2008 ; 50(5):255-260.
- 19-Miyazaki J, Ba-Thein W, Kumao T, Obata Yasuoka M, Akaza H, and Hayshi H. *Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic Escherichia coli to adhere to and invade bladder epithelial cells.* Immunol Med Microbiol. 2002; 33: 23-26.
- 20-Soderhall M. *The importance of Escherichia coli fimbriae in urinary tract infection.* Department of Nephrology. 2001; 1-8.
- 21-Khan AS, et al. *Receptor structure for FIC fimbriae of uroathogenic Escherichia coli.* Infect Immun. 2000; 68(6): 3541-3547.
- 22- Farshad Sh, and Emmamghorashi F. *The prevalence of virulence genes of E.coli strains isolated from children with urinary tract infection.* Saudi J Kidney Dis Transpl. 2009 ; 20(4):613-617.
- 23-Mitsumori K, Terai A, Yamamoto SH, and Yoshida O. *Identification of S, FIC and three PapG FImbrial adhesins in uropathogenic Escherichia coli by polymerase chain reaction.* FEMS Immunol Med Microbiol. 1998;21, 261-268.
- 24-Holoda E, Vu-KHac H, Andraskova S, Chomova Z, Wantrubova A, Krajnak M, and Pilipcine E. *PCR assay for detection and differentiation of K88ab₁, K88ab₂, K88ac, K88ad fimbrial adhesins in E.coli strains isolated from diarrheic piglets.* J Folia Microbiol. 2005; 50 (2).107-112.
- 25-Lane MC, Simms AN, Mobley HL. *Complex interplay between type 1 fimbrial expression and flagellum-mediated motility of uropathogenic Escherichia coli.* J Bact. 2007; 189: 5523-5533.
- 26-Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, et al. *Extended virulence genotypes and phylogenetic background of Escherichia coli isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis.* J infect Dis. 2005; 191: 46-50.