University of Thi-Qar Journal Of Science (UTsci)
Website: http://jsci.utq.edu.iq Email: utjsci@utq.edu.iq
Volume 6, Number 1, December 2016

التحري عن قابلية البكتريا الممرضة للجهاز البولي على تكوين الغشاء الحيوي و تقييم طرق الكشف عنه

علا عبد الجليل إبراهيم

قسم علوم الحياة – كلية العلوم– جامعــة ذي قار
Email:ulajaleel_2006@yahoo.com

الخلاصة:

تم جمع عشرين عينة ادرار لمرضى يتكرر لديهم التهاب المجاري البولية الحاد. وقد شخص وجود ثلاث أنواع بكتيرية مسببة لهذه الحالات المرضية وكان المسبب الرئيسي ل 85% منها يعود لبكتريا *E.coli* وكانت عائدية المتبقي منها لكل من *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumonia*. و للكشف عن قابلية هذه العزلات على تكوين ألغشاء الحيوي Biofilm تم استخدام طريقتين مختلفتين وهي طريقة tube method (TM) وقد اتضح منها ان *E.coli* تمتلك فعالية عالية على تكوين الغشاء الحيوي في الزجاج وكذلك بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* في حين كانت قدرة بكتريا *Klebsiella pneumonia* على تكوين الغشاء متوسطة. ولوحظ عند استخدام الطريقة الثانية Congo red method(CRA) ان جميع العزلات مكونة للغشاء الحيوي عند زرعها على وسط CRA وذلك بظهور مستعمرات سوداء اللون باستثناء 5% من العزلات ترجع لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* كانت سالبة لهذا الاختبار حيث ظهرت المستعمرات فيها باللون الأحمر وهذا يدل على عدم قابليتها على انتاج الغشاء الحيوي.وتبين ان الطريقة الأولى اكثر دقة من الأخرى في اظهار درجة تكون الغشاء الحيوي بالعين المجردة وان كلتا الطريقتين تعتبران طرق نوعية وليست كمية. وهدفت الدراسة للتحري عن قابلية البكتريا المعزولة من اشخاص مصابين بالتهاب المجاري البولية الحاد والمتكرر UTI والمرافق لحصى الكلية على انتاج الغشاء الحيوي (Biofilm) .

الكلمات المفتاحية: الغشاء الحيوي , التهاب المجاري البولية , بكتريا ممرضة للجهاز البولي

Detection the ability of Uropathogenic bacteria to produce Biofilm and Evaluation the Screening methods

Ola Abdul Jaleel Ibrahim

Biology department – Science College – Thi-qar University

Email:ulajaleel_2006@yahoo.com

Abstract:

twenty urine samples were collected from patients have acute inflammation of the urinary tract with kidney sands . three types of bacteria were isolated from samples. it was found that the main causative agent for 85% of these conditions due to *E.coli* while the remaining ones belongs to *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. to detect the ability of these isolates to form biofilm . two different methods were used , the first method is tube method (TM) showed that *E. coli* possesses high effectiveness of biofilm formation in the glass as well as *Pseudomonas aeruginosa* while the bacterium *Klebsiella pneumoniae* able to form biofilm moderately. It was observed when using the second method Congo red method (CRA) that all isolates composed biofilm when cultured on CRA except 5% of isolates belongs to bacterium *Pseudomonas aeruginosa* was negative for this test, . the first method is more accurate than the other to show the degree of biofilm formation to the naked eye,

and both methods are considered qualitative not quantitative. The present study aims to investigate the ability of bacteria isolated from people with frequent urinary tract infections UTI associated with kidney stones on biofilm production .

Keywards: Biofilm , Urinary tract infection , Uropathogenic bacteria

1- المقدمة

يعد التهاب المجاري البولية Urinary tract infection (UTI) من المشاكل الصحية واسعة الانتشار بشكل كبير بين الأشخاص من مختلف الاعمار ومن كلا الجنسين ويعرف من خلال وجود كائنات حية مجهرية في عينات الادرار التي تجمع بشكل صحيح من المرضى المصابين. (Makia *et al.*, 2013) من اكثر المسببات والممرضات المرتبطة بالتهاب المجاري البولية في العادة هي افراد العائلة المعوية Enterobacteriacea والمكورات العنقودية *Staphylococcus* spp. وبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* إضافة الى أنواع من الفطريات مثل *Candida* spp. وذلك لان غالبيتها تمتلك عوامل ضراوة تمكنها من اجتياح الجهاز البولي urinary tract system (باقر , 2008) وتتميز هذه الخلايا البكتيرية بأن لها القدرة على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm وهو عبارة عن نظام بيئي ميكروبي معقد جدا حيث يتكون من خلايا احياء مجهرية دقيقة كالبكتريا مثلا. (Donlan and Costerton 2002). و يعرف الغشاء الحيوي بشكل شامل وعام على انه " تقييد والتصاق خلايا ميكروبية على سطوح قد تكون حية او غير حية بواسطة مواد عبارة عن بوليمرات عضوية معقدة تفرزها الخلايا الميكروبية نفسها الى الخارج لتشكل المادة الأساس التي تستند عليها لتعمل على تكوين نظام بيئي فعال وظيفيا ومستقل." ويعرف أيضا على انه" تكدس معقد من الكائنات الحية المجهرية الناتج من التصاقها وارتكازها على سطح وافرازها لمواد متبلمرة تعمل على تحصينها." (Percival *et al.*, 2011) ان عملية تكون وتقدم الغشاء الحيوي الناضج تكون متعددة المراحل وهي تعتمد على عدد من المتغيرات من بينها نوع الكائن المجهري طبيعة السطح الذي سيستند عليه الميكروب , العوامل البيئية والتعبير الجيني للجينات المسؤولة عن تكوين الغشاء الحيوي (Douglas, 2003) ان علاقة الاغشية الحية هذه بالامراض تكون من خلال امتلاكها لميزات واليات فعالة وهي تعتبر من الاليات الامراضية للبكتريا حيث انها تشكل مستودع خطير وبؤرة تنطلق منها لتسبب امراض خطرة في اعضاء مختلفة من الجسم تتمثل بقابلية الخلايا المتحررة والمنفصلة عن السطوح الخارجية لتجمعات الاغشية الحيوية المتكونة على الأدوات الطبية على الانتقال الى أعضاء أخرى في الجسم مسببة التهابات جديدة.ومن الأمثلة عليها الترسبات التي تغطي الاسنان (dental plaques). (Donlan, R., 2001) ضمن الغشاء الحيوي تزداد قابلية الخلايا على تبادل البلازميدات المقاومة للمضادات بشكل كفوء عبر عملية الاقتران ويساعدها في ذلك القرب المكاني فيه اكثر مما يحدث بين الخلايا وهي بشكل عالق . وهذا يمكن البكتريا من مقاومة العلاج بالمضادات الحياتية حيث تزداد نسبة المقاومة في بعض الحالات الى 1000 ضعف عن البكتريا العائمة غير المكونة للغشاء الحيوي (الخفاجي ,2008) وتصبح البكتريا المرتبطة به اكثر مقاومة للجهاز المناعي للجسم حيث تكون محمية بشكل كبير لتعدد الطبقات ضمن النظام بما يشبه النسيج الغشائي matrix في biofilm والذي يكون له دور مهم جدا في زيادة تماسك واتحاد biofilm وحماية الخلايا الميكروبية الموجودة فيه حيث يعد هذا النّسيج قويّ جدّا إلى درجة أنّ في ظروف معيّنة biofilms يمكن أن تصبح متحجّرة (Palmer and White 1997). ومن فوائد البيوفلم للبكتريا التي تعيش فيه مقارنة بتلك التي تتواجد عائمة وحرة ان الأولى تكون محمية وقادرة على التواصل والتعاون مع الافراد الأخرى ضمن محيط تواجدها . حيث تزداد المقاومة ضدّ المنظّفات الكيميائيّة والمضادّات الحيويّة إذ أنّ النّسيج الخلوي الكثيف والطّبقة الخارجيّة للخلايا يحميان المجتمع الدّاخليّ (الخلايا المتواجدة في أعماق biofilm) (Donlan and Costerton, 2002) وتعتبر البكتريا المرتبطة بالتهاب المجاري البولية الحاد المعقد والذي يتطلب اللجوء لل catheters (انابيب القسطرة) لها قدرة كبيرة على تكوين غشاء حيوي على هذه الانابيب (Hooton, 2000) وهدفت الدراسة الحالية للتحري عن قابلية البكتريا المعزولة من عينات ادرار لمرضى مصابين بالتهاب المجاري البولية الحاد والمتكرر المرافق لوجود حصى الكلية غير مرتبط باستخدام انابيب القسطرة (التهاب مجاري بولية غير معقد) على تكوين الغشاء

University of Thi-Qar Journal Of Science (UTsci)
Website: http://jsci.utq.edu.iq Email: utjsci@utq.edu.iq
Volume 6, Number 1, December 2016

الحيوي Biofilm كنوع من عوامل الضراوة باستخدام طريقتين مختلفتين هما Tube Method ,Congo red method وتقييم دقة تلك الطرق .

2- المواد وطرق العمل:

2-1 جمع العينات:

تم جمع 20 عينة ادرار من اشخاص مصابين بالتهاب المجاري البولية الحاد والمتكرر المرافق لحصى الكلى غير المعقد من مستشفى سوق الشيوخ والحسين لمرضى تتراوح أعمارهم ما بين (18-65) سنة خلال الفترة الزمنية من 2016/2/1 ولغاية 2016/3/1 .حيث تم نقل العينات مباشرة الى مختبرات قسم علوم الحياة في كلية العلوم-جامعة ذي قار لغرض زرع العينات وتشخيصها.

2-2 العزل والتشخيص :

تم زرع العينات مباشرة على وسط MacConkey agar ووسط Blood agar و وسط Nutrient agar ثم حضنت الاطباق لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37°C و 42°C. وبعد انتهاء مدة الحضن تم فحص الوسط والمستعمرات البكتيرية النامية عليه وشخصت حسب الصفات المظهرية للمستعمرات البكتيرية وشكل وتصبيغ الخلايا . تم زراعة البكتريا النامية على أوساط أخرى واجراء الاختبارات الكيموحيوية التقليدية عليها .

(Vandepitte *et al.*, 2003)

2-3 طرق التحري عن قابلية البكتريا المعزولة على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm

2-3-1 Tube method(TM)

تم في هذه الطريقة وحسب Christensen *et al.*,(1985) زرع Loopful من البكتريا قيد الدراسة في 10 ml من وسط Trypticase soy broth الحاوي على 1 % من سكر الكلوكوز في انابيب زجاجية ومن ثم حضنها بدرجة حرارة 37°C لمدة 24 ساعة وبعد انتهاء مدة الحضن ازيل الوسط من الانابيب وغسلت عدة مرات بمحلول Phosphate buffer (pH=7.3) Saline (PBS buffer) والذي حضر مسبقا حسب (Hudson and Hay,1989) وتركت لتجف تماما بدرجة حرارة الغرفة ومن ثم صبغت بصبغة Crystal violet 0.1 %. ازيلت الصبغة الزائدة وغسلت بالماء المقطر وتركت الانابيب لتجف ثانية بشكل مقلوب وتم قراءة النتائج اعتمادا على تكون طبقة سميكة ودرجة سمك تلك الطبقة على الجدران الداخلية للانابيب الزجاجية وكذلك على قعر الانابيب .

2-3-2 Congo Red Agar method (CRA)

تم تحضير الوسط بإذابة 37 g في اللتر الواحد يضاف لها سكر السكروز Sucrose 50 g/L و agar 10 g/L

واضيفت صبغة Congo Red stain 0.8 g/L حيث حضرت الصبغة على حدة كمحلول مركز وعقم بشكل منفصل واضيف الى الوسط بعد تعقيمه .زرعت الاطباق الحاوية على أوساط CRA بالبكتريا قيد الدراسة وحضنت الاطباق بدرجة37°C لمدة 24 ساعة وتم قراءة النتائج على أساس نمو مستعمرات سوداء اللون هو دلالة على تكون الغشاء الحيوي من قبل تلك البكتريا اما المستعمرات الحمراء فتعطي نتيجة سالبة للاختبار (Freeman *et al.*1989)

University of Thi-Qar Journal Of Science (UTsci)
Website: http://jsci.utq.edu.iq Email: utjsci@utq.edu.iq
Volume 6, Number 1, December 2016

3- النتائج والمناقشة

شخصت العزلات اعتمادا على شكل المستعمرات ,حجمها ,حافات المستعمرة ولونها وتغير لون الوسط المحيط بها وكذلك باستخدام الاختبارات البايوكيميائية التقليدية Biochemical tests .

حيث أظهرت الاختبارات التشخيصية الحصول على عزلات البكتريا *E.coli* و *Klebsiella pneumonia* و Pseudomonas *aeruginosa* وكما هو مبين في الجدول (1)

جدول(1) يبين الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية للعزلات البكتيرية

Pseudomonas aeruginosa	***Klebsiella pneumoniae***	***E.coli***	**نوع البكتريا / الاختبار**
non Lactose fermentor	Lactose fermentor	Lactose fermentor	**MacConkey Agar**
Alkaline slant over alkaline deep(K/K)	Acid slant over acid deep (A/A)	Acid slant over acid deep (A/A)	**TSI slants**
Negative	negative	Negative	**H2S production**
Positive	negative	positive	**Motility**
Positive	negative	negative	**Citrate utilization**
Positive	negative	negative	**Growth at 42 ˚C**
Positive	negative	negative	**Pyocyanin production**

أظهرت النتائج ان اغلب العزلات المأخوذة من المرضى كانت تعود لبكتريا *E.coli* بنسبة 85% وكانت عائدية عزلة واحدة فقط لبكتريا *Klebsiella pneumoniae* وعزلتين فقط لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* وحسب الجدول(2)

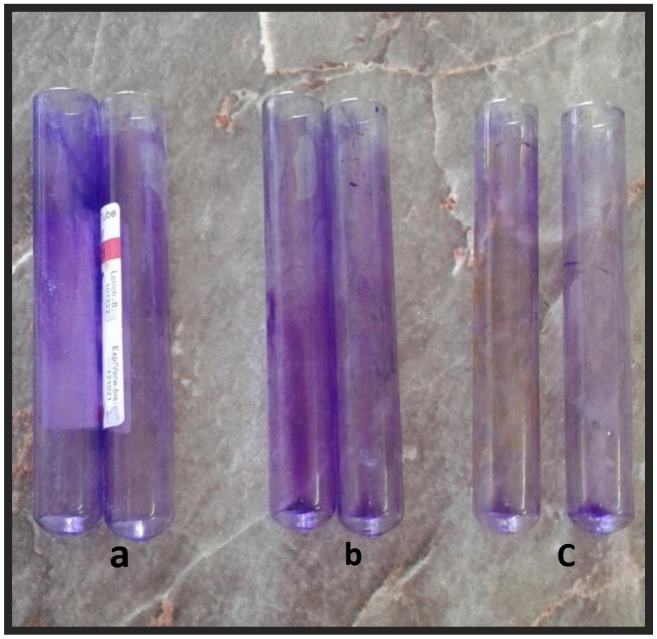
العزلة	**النسبة من العينات**	**عدد العزلات**

جدول (2) يبين نسبة كل نوع بكتيري من العزلات

17	%85	*E.coli*
1	%5	*Klebsiella pneumoniae*
2	%10	*Pseudomonas aeruginosa*

1-3 اختبار Tube Method

بعد اجراء الاختبار على العزلات لوحظ ان بكتريا *E.coli* كانت لها قابلية عالية على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm وكذلك الحال بالنسبة لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* اما *Klebsiela peumoniae* فكانت درجة تكوينها للغشاء الحيوي متوسطة نوعا ما كما هو موضح في الشكل (1) .



الشكل (1) قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة TM يبين من اليسار

a. بكتريا *E.coli* B. *Pseudomonas aeruginosa* C. *Klebsiela peumoniae*

صنفت درجة تكوين biofilm الى قوية , متوسطة , ضعيفة و غير قادرة على تكوين biofilm في طريقة TM كما هو موضح في الجدول (3) .

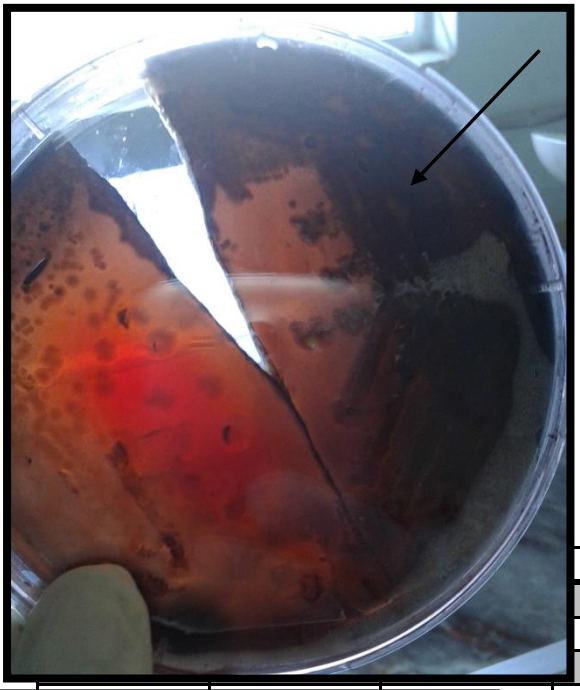
جدول (3) العزلات البكتيرية ودرجة تكوينها للغشاء الحيوي بطريقة TM

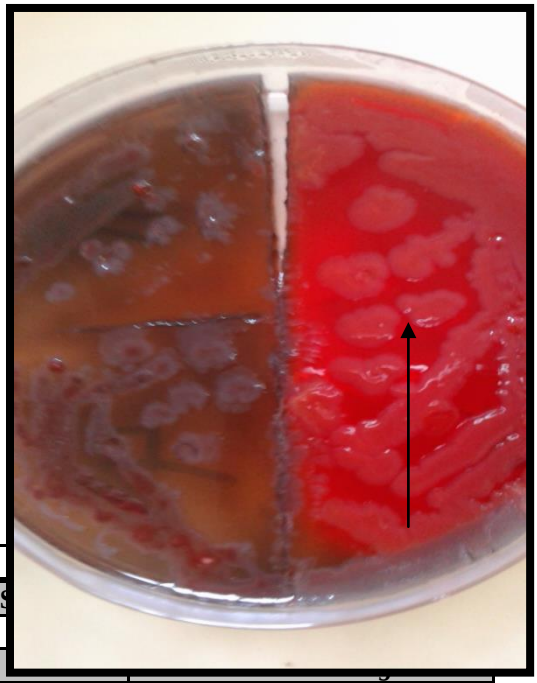
University of Thi-Qar Journal Of Science (UTsci)
Website: http://jsci.utq.edu.iq Email: utjsci@utq.edu.iq
Volume 6, Number 1, December 2016

طريقة tube method أظهرت ان 95% من العزلات هي موجبة لهذا الاختبار أي بمعنى انها مكونة للغشاء الحيوي بنسب متفاوتة فقد كانت *E.coli* و *Pseudomonas aeruginosa* مكونة للغشاء بشكل فعال جدا في حين *Klebsiella pneumonia* كانت متوسطة الى ضعيفة .

2-3 اختبار Congo red method

كان ناتج اختبار CRA ظهور المستعمرات باللون الأسود على وسط ال Congo red agar دلالة على تكوينها للغشاء الحيوي لجميع العزلات البكتيرية كما في الشكل (2) و (4) ووجد ان عزلة واحدة فقط لبكتريا Pseudomonas aeruginosa غير قادرة على تكوين الغشاء الحيوي فظهرت المستعمرات باللون الأحمر كما هو مؤشر عليه بالشكل (3)





Klebsiela peumoniae

الشكل (3) يوضح المستعمرات باللون الأحمر على وسط CRAغير قادرة على انتاج الغشاء الحيوي

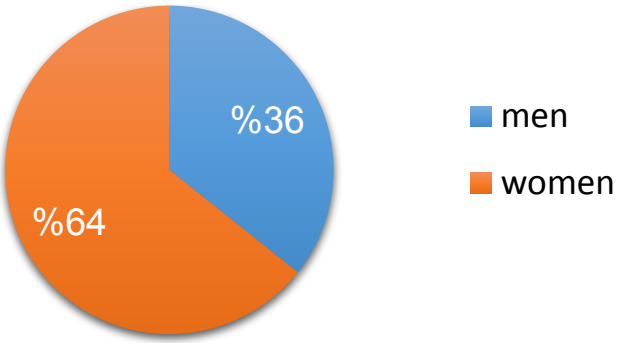
الشكل (2) يوضح

University of Thi-Qar Journal Of Science (UTsci)
Website: http://jsci.utq.edu.iq Email: utjsci@utq.edu.iq
Volume 6, Number 1, December 2016

الشكل (4) يبين المستعمرات السوداء على وسط CRA لبكتريا *E.coli*

من الملاحظ ان اغلب المرضى كان المسبب الرئيسي لحالاتهم المرضية هو بكتريا ال *E.coli* بالنسبة للعينات قيد الدراسة الحالية كما أظهرت الدراسة ان نسبة الإصابة ب UTI عند النساء اعلى من الرجال حيث كانت النسبة 64.28 % من المرضى هم من النساء بينما كان 35.72% من المرضى هم من الرجال كما موضح بالشكل (5) .وهذا يتفق مع ما هو مثبت في دراسات عديدة ان نسبة الإصابة ب UTI ترتفع بين النساء اكثر من الرجال بشكل عام حول العالم لعوامل تشريحية وفيزيائية (Mansour *et al.,* 2009) وكانت هذه النسب مقاربة الى حد كبير لنتائج Kashef *et al.,* (2010) و وجد ان 95% من العزلات مكونة للغشاء الحيوي وان 89% منها هي لبكتريا *E.coli* التي كانت المسبب الرئيسي لل UTI وهو يختلف عن ما توصلت اليه Makia *et al.*,(2013) حيث اشارت نتائجها ان المسبب الرئيسي لحالات UTI هو بكتريا *Klebsiella , Proteus* الا انها تتفق مع العديد من الدراسات التي تثبت ان E. coli هي المسبب الرئيسي لها باعتبارها ممرض Uropathogenic مهم كما ان الدراسة الحالية مشابهة تقريبا لنتائج دراسة عراقية, حيث أظهرت Al-Chalabi, R. N. (2007) ان بكتريا *Enterobacter* , *Pseudomonas*تمثل مسبب رئيسي ثانوي لحالات UTI وبالذات النوع المعقد منه المرتبط بانابيب القسطرة لان هذه الأنواع عادة ما تقترن بالإصابات الناتجة عن المستشفيات لمقاومتها العالية للمضادات الحياتية وتعتبر مسؤولة عن خمج المستشفيات بشكل كبير (Pitout *et al.*,2005) وتعد بكتريا *E.coli* مسؤولة عن ما يقرب من 80% من كل الإصابات ب UTI وتسبب ما يسمى Bacteriurea حيث يعزى ذلك لانتاجها عوامل ضراوة مختلفة وعديدة تتضمن adhesins والسموم منها (haemolysin) (Svanborg and Godaly,1997) و يلعب تكوين الغشاء الحيوي من قبل البكتريا دور مهم في امراضيتها وتم التحري عنه بطريقتين مختلفتين . طريقة TM تعتبر فحص اكثر دقة من اختبار CRA فبالامكان تحديد درجة تكون الغشاء الحيوي بالعين المجردة اعتمادا على تقدير سمك الغشاء المتكون على السطح الداخلي للانابيب .اما اختبار CRA فيعتبر فحصا بسيطا وسهلا وغير مكلفا الا انه يعطي نتيجة غير حساسة بشكل دقيق لكفاءة تكوين الغشاء الحيوي وبالتالي يحدد فقط قابلية البكتريا على انتاج الغشاء الحيوي من عدمها وتعتبر اسهل للباحث في الكشف المبدئي عن تكوين الاغشية الحيوية. وبشكل عام فان كلا الطريقتين بالإمكان استخدامها للتحري عن انتاج الغشاء الحيوي بشكل نوعي وليس كمي ولوحظ ان بكتريا *E.coli* و *Pseudomona aeruginosa* كان تكوينها للغشاء الحيوي بشكل فعال اما بكتريا *Klebsiella pneumoniae* كانت درجة تكوينها للغشاء اقل من الأنواع الأخرى كما سجلت الدراسة ان 5% فقط من العزلات كانت سالبة النتيجة وتفتقد القدرة على تكوين الغشاء الحيوي وتظهر الدراسات ان البكتريا تختلف في قابليتها على تكوين الغشاء الحيوي طبيعة الكائن المنتج والظروف البيئية المحيطة به من درجة الحرارة و pH ونوع UTI فمثلا ان E.coliالمعزولة من اشخاص مصابين بالتهاب البروستات لها فالية اكبر في انتاج biofilm وبسمك اكبر من تلك المعزولة من اشخاص مصابين ب Cystitis (Al-Chalabi *et al.*, 2010)

يعتبر تكوين الميكروبات للغشاء الحيوي مرتبط ارتباطا وثيقا بمقاومة البكتريا للعقاقير المضادة للميكروبات مما يزيد من فرصة تحول UTI الى التهاب مزمن ضعيف الاستجابة للعلاج بالمضادات التقليدية وهو مما يزيد من احتمالية انتشار المقاومة للمضادات من خلال انتقال الجينات المسؤولة عنها وزيادة معدلات الطفرة في الخلايا البكتيرية (Niveditha *et al.*, 2012)



الشكل(5) نسبة الإصابة ب UTI عند النساء والرجال

References

الخفاجي ، زهرة محمود (2008) . التقنية الحيوية الميكروبية (توجهات جزيئية) . معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية . جامعة بغداد .

باقر ,هيثم عزت , اشواق الهاشمي و امنة الثويني.(2008). دراسة ميكروبايولوجية لبكتريا Escherichia coli O157 : H7 من الاسهال الدموي عند الأطفال دون سن العاشرة. المجلة العراقية للعلوم .المجلد 49 العدد (1): 9-94

Al-Chalabi, R. N. (2007). Relationship between Hemolysin Production and Biofilm Formation by Uropathogenic Escherichia coli. M. Sc. Thesis, collage of science of Al- Nahrain University.

Al-Chalabi ,R., A. Al –Ubaidy and M. Al- Ibadi.(2010). Detection of Urovirulence Genes (*eae,E-hly,α-hly*) of Uropathogenic *Escherichia coli* by Specific PCR.J Biotechnol Res .4(1):44-54

Christensen, G.D., W.A. Simpson, J.J .Younger and B .Baddour.(1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol. 22:996–1006.

Donlan RM and J.W .Costerton. (2002).Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev.15:167-93.

Donlan, R. (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. Clin. Infect. Dis. 33: 1387-1392.

Douglas, L.J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol .11:30–36.

Freeman, D.J., F.R .Falkiner and C.T .Keane.(1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol. 42:872-4.

Hooton ,T.M.(2000).Pathogenesis of urinary tract infections: an update. J Antimicrob Chemother. 46:1–7.

Hudson, L. and F.C. Hay.(1989).Practical immunology.(3rd ed.).Blackwell Scientific Publications.Oxford.England.P:507.

Kashef N, G.E. Djavid and S .Shahbazi (2010). Antimicrobial susceptibility patterns of community-acquired uropathogens in Tehran, Iran. J. Infect. Dev. Ctries. 14(4): 202-206.

Makia, R. S. , M.C. Ismail and A.M.A. Fadhil.(2013). Biofilm production as a virulence factor in Uropathogenic bacteria and yeasts .J.Biotechnol.res.c.7(1):29-34.

Mansour, A. ,M. Mehdinejad and Z.Pourdangchi .(2009). Study of bacteria isolated from urinary tract infections and determination of their susceptibility to antibiotics . Jundishapur J. Microbio. 2(3): 118-123.

Niveditha,S, S.Pramodhini, S. Umadevi, S.Kumar and S. Stephen.(2012). The Isolation and the Biofilm Formation of Uropathogens in the Patients with Catheter Associated Urinary Tract Infections (UTIs). J Clin Diagn Res.6(9): 1478–1482.

Palmer R. J. and D.C. White .(1997). Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. Trends Microbiol. 5:435–440.

Percival, S.L. , S. Malic ,H. cruz and D.W. Williams.(2011).Introduction to biofilms . Springer-Verlag Berlin Heidelberg.pp.41-68.

Pitout, J. D., P. Nordmann and K. B. Laupland. (2005). Emergence of Enterobacteriaceae producing adhesion and biofilm formation in Escherichia coli. J. Bacteriol. 183:7213 – 7223.

Svanborg C, and Godaly G.(1997). The bacterial virulence in urinary tract infections. Infect. Dis. Clin. North Am. 11:513–29.

Vandepitte , J.(2003). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. 2nd ed.p.155. W H O. Geneva.