جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

Kowsar Medical Journal
Vol. 15, No. 2, Summer 2010
Pages: 65-69

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۹
صفحات: ۶۹-۶۵

مقایسه تنوع ژنی *fimH* در *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن و فلور روده

جلیل فلاح مهرآبادی[۱] *PhD*، هدی غربا[*] *MSc*، عباسعلی ایمانی فولادی[۲] *PhD*، حمیده روحانی‌نژاد[۳] *MSc*،
سید سعید امینی حسینی[۴] *MSc*

[*]گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران
[۱]مرکز تحقیقات کلیه و مجاری ادراری، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
[۲]مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
[۳]گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران
[۴]شرکت ژن‌فناوران، تهران، ایران

چکیده

اهداف: از آنجایی که پروتئین FimH در کلونیزاسیون سویه‌های UPEC و ایجاد عفونت نقش بسیار مهمی دارد، تهیه واکسن حاوی این ادهسین مورد توجه است. هدف از این مطالعه، بررسی تنوع توالی ژن *fimH* در ایزوله‌های ادراری و مدفوعی بود.

مواد و روش‌ها: از ۱۵ فرد مبتلا به عفونت ادراری با منشا *اشریشیا کلی*، نمونه ادرار و مدفوع گرفته شد. پس از کشت نمونه‌ها، کلنی‌های مشکوک به *اشریشیا کلی* جدا شده و با آزمون‌های بیوشیمیایی تایید شدند. ایزوله‌های *اشریشیا کلی* ادراری و مدفوعی در محیط LBبراث کشت داده شده و یک شب انکوبه شدند. DNA ژنومی استخراج و ژن *fimH* با PCR تکثیر شد. آنالیز توالی ژن با نرم‌افزارهای MEGA4، ClustalW و CLC Bio انجام شد.

یافته‌ها: در همترازی توالی ژن *fimH* مربوط به ایزوله‌های ادراری با ژن *fimH* مربوط به سویه‌ی UTI 89 جهش‌های متعددی مشاهده شد. همچنین اختلاف توالی بین سویه‌های بیماری‌زای جداشده از ادرار و سویه‌های غیربیماری‌زای مدفوعی وجود داشت. توالی *fimH* ایزوله‌های مدفوعی در پایانه C دارای جهش‌های بی‌معنی بود.

نتیجه‌گیری: با وجود شباهت ۱۰۰ درصدی توالی ژن *fimH* در ۴ ایزوله ادراری و مدفوعی، اختلاف توالی در ژن و پروتئین FimH سبب می‌شود ایزوله‌های بیماری‌زا قدرت اتصال بیشتری به سلول‌های یوروتلیال داشته باشند. جهش بی‌معنی در پایانه C منجر به تولید پروتئین ناقص FimH می‌شود که می‌تواند در اتصال سویه‌های مدفوعی به سلول‌های یوروتلیال تاثیرگذار باشد، بااین حال، عامل اتصال به‌تنهایی در بیماری‌زایی *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن نقش ندارد.

کلیدواژه‌ها: *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن، عفونت ادراری، تنوع ژنی، پیلی تیپ I

Comparing of *fimH* gene variation in normal flora and uropathogenic *Escherichia coli*

Fallah Mehrabadi J.[1] *PhD*, Ghoraba H.* *MSc*, Imani Fooladi A. A.[2] *PhD*, Rohaninejad H.[3] *MSc*, Amini Hosseini S. S.[4] *MSc*

[*]Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
[1]Research Center of Nephrology and Urology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
[4]Gene Fanavaran Company, Tehran, Iran

Abstract

Aims: Since FimH protein has a main role in colonization of UPEC strains and causing infection, preparing the vaccine containing this adhesion is concerned. The aim of the study was to investigate the *fim*H gene variation among urinary and feces isolates.

Materials & Methods: Urine and feces samples were taken from 15 patients affected by UTI, with the origin of *Escherichia coli*. After the culture of samples, *Escherichia coli* suspected colonies were separated and confirmed by biochemical tests. Urine and feces' *Escherichia coli* isolates were cultured in LB Broth environment and were incubated one night. Genomic DNA was extracted and *fim*H gene was amplified using PCR. The gene sequence analysis was carried out using MEGA4, ClustalW and CLC Bio software.

Results: In the alignment of *fim*H gene sequence related to the urine isolates with *fim*H gene associated with UTI 89 strain several mutations were observed. Moreover, there was the sequence difference between pathogenic strains isolated from urine and non-pathogenic feces strains. *fim*H sequence of feces isolates in C-terminal had insignificant mutations.

Conclusion: Despite the 100 percent similarity of *fim*H gene sequence in four urinary and feces isolates, the difference of sequence in FimH protein and gene causes pathogenic isolates to have more affinity to urothelial cells. Insignificant mutation in C-terminal leads to the formation of truncated FimH, which can affect the attachment of feces strains to urotheilial cell; however, attachment factor has no role in Uropathogenic *Escherichia coli* pathogenic by itself.

Keywords: Uropathogenic *Escherichia coli*, Urinary Tract Infection, Gene Variation, Pili Type I

نویسنده مسئول: هدی غربا. تمام درخواست‌ها باید به نشانی ghoraba_h@yahoo.com فرستاده شوند.

دریافت مقاله: ۸۹/۳/۱ پذیرش مقاله: ۸۹/۳/۴

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

اشریشیا کلی، گونه‌ای از باکتری‌هاست که توانایی کلونیزه‌شدن و دوام در زیستگاه‌های متعدد محیطی و میزبان‌های جانوری را دارد. *اشریشیا کلی* و سایر باکتری‌های فلور روده‌ایِ جانوران غالباً با میزبان‌های خود رابطه همزیستی دارند، به‌طوری که مواد غذایی را از آنها تامین کرده و در مقابل، در ایجاد پیام‌های کلیدی برای تکامل و تنظیم سیستم ایمنی و محافظت میزبان در برابر پاتوژن‌ها نقش دارند. برخی سویه‌های *اشریشیا کلی* از محل زندگی خود خارج شده و توانایی ایجاد بیماری در میزبان را به‌دست می‌آورند. این سویه‌های بیماری‌زا به‌عنوان *اشریشیا کلی* اسهال‌زا یا *اشریشیا کلی* بیماری‌زای خارج روده‌ای طبقه‌بندی می‌شوند [۱]. سویه‌های *اشریشیا کلی* بیماری‌زای خارج روده‌ای می‌توانند در محل‌هایی مانند خون، سیستم اعصاب مرکزی و سیستم ادراری، کلونیزه شده و سبب بیماری شوند. در بین سویه‌های *اشریشیا کلی* بیماری‌زای خارج روده‌ای، سویه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن (UPEC) شایع‌ترین سویه‌های عامل بیماری در انسان هستند. این باکتری‌ها عامل عفونت مجرای ادراری (۹۵-۷۰٪) و بخش عمده‌ای از عفونت ادراری بیمارستانی (۵۰٪) محسوب می‌شوند [۲، ۳].

این سویه‌ها، دارای پیلیِ تیپ ۱ هستند که غالباً به چسبیدن به نسج مخاطی واژن و مجاری ادراری تمایل دارند. اتصال، مرحله ضروری در آغاز کلونیزاسیون باکتری در سطوح مخاطی میزبان است. اعضای چسبنده در سویه‌های UPEC عبارت از پیلی S، ادهسیوهای خانواده Dr، پیلی P و پیلی تیپ ۱ هستند که پیلی‌تیپ ۱ بیشتر در ارتباط با ایجاد سیستیت توسط سویه‌های حامل است. برای بیان و مونتاژ پیلی تیپ ۱، حداقل ۹ ژن که در دسته ژنی *fim* قرار دارند، نیاز است. مطالعات نشان داده‌اند که FimH برای جذب باکتری به داخل سلولِ اپی‌تلیالِ مثانه لازم است [۲، ۳].

بیش از ۹۵٪ ایزوله‌های *اشریشیا کلی*، پیلی تیپ ۱ را بیان می‌کنند و این در حالی است که سویه‌های کومنسال نیز از این پیلی برای کلونیزاسیون استفاده می‌نمایند. از طرف دیگر همان‌گونه که ذکر شد، سویه‌های یوروپاتوژن برای اتصال به سلول‌های یوروتلیال از پیلی تیپ ۱ کمک می‌گیرند. از آن‌جایی که پروتئین FimH در اتصال نقش اساسی دارد، بنابراین توالی این پروتئین حایز اهمیت است. میزان اتصال پروتئین FimH به گیرنده‌های منومانوز نسبت به گیرنده‌های تری‌مانوز، ۱۵برابر کمتر است. علت این امر را تنوع در توالی این پروتئین ذکر کرده‌اند [۴].

هدف از این مطالعه، بررسی تنوع ژنی *fimH* در ایزوله‌های عفونت ادراری به‌عنوان سویه‌های پاتوژن و ایزوله‌های مدفوعی به‌عنوان سویه‌های کومنسال در بیماران فاقد علایم گوارشی بود. نکته قابل تمایزِ این تحقیق نسبت به سایر تحقیقات انجام‌شده این بود که هر دو نمونه از یک فرد، جدا شده و توالی ژن و پروتئین FimH در آنها با هم مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

از ۱۵ بیماری که طی دوره زمانی مهرماه تا فروردین‌ماه سال ۱۳۸۸ با علایم عفونت ادراری در یکی از بیمارستان‌های شهر تهران بستری بودند، نمونه ادرار و مدفوع گرفته شد. سپس نمونه‌های ادرار روی محیط‌های کشت بلاداگار و EMB آگار کشت داده شده و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. نمونه‌های مدفوعی نیز در محیط سلنیت F غنی‌سازی شده و روی EMB آگار کشت داده شدند. کلنی‌های مشکوک به *اشریشیا کلی*، روی محیط‌های افتراقی TSI، سیمون‌سیترات، اوره‌آز، MR/VP و SIM کشت داده شده و پس از تایید *اشریشیا کلی* بودن آنها [۵]، کلنی‌های مربوطه در محیط Skim milk در ۷۰°C- نگهداری شدند تا در مراحل بعدی، از این ایزوله‌ها استفاده شود.

استخراج DNA ژنومی و انجام PCR: ایزوله‌های *اشریشیا کلی* ادراری و مدفوعی، جداگانه در محیط LB broth کشت داده شده و یک شب انکوبه شدند. سپس با استفاده از روش فنل‌کلروفرم از ایزوله‌های بالینی، DNA ژنومی استخراج شد. برای انجام PCR، پرایمرهای مورد نظر برای تکثیر ژن fimH طراحی شدند. به همین منظور توالی نوکلئوتیدی ژن *fimH*/*اشریشیا کلی* سویه UTI89، با شماره دسترسی gi91209055 از بانک ژنی NCBI به‌دست آمد. این توالی دارای ۹۰۳ جفت باز بوده و ۳۰۱ اسیدآمینه را کد می‌کند. پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner با درنظرگرفتن مواردی همچون دمای اتصال (Tm)، درصد G+C، عدم تولید لوپ یا حلقه درون هر یک از پرایمرها در بالادست و پایین‌دستِ کدون‌های شروع و خاتمه ژن *fimH* طراحی شدند. با استفاده از برنامه BLAST، مناسب‌بودن پرایمرِ طراحی‌شده، مورد تایید قرار گرفت. توالی و مشخصات پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن *fimH*

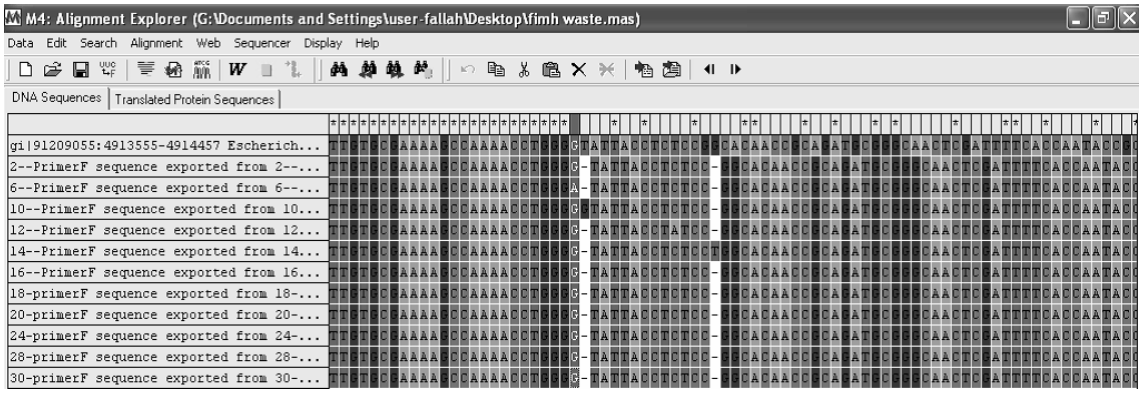
نوع پرایمر	توالی پرایمرها	طول
پیش‌رو	5'-TCCCGTTACAGGTCAGAGC-3'	mer۱۹
معکوس	5'-GTGCAGGTTTTAGCTTCAGG-3'	mer۲۰

سپس ژن *fimH* با استفاده از آنزیم تک‌پلیمراز و در ادامه با آنزیم DNAپلی‌مراز و روش PCR تکثیر شد. محصول PCR روی ژل آگارز بررسی شده و با استفاده از کیت تخلیص DNA (Fermentas؛ آلمان) از ژل، تخلیص و برای توالی‌یابی به خارج از کشور ارسال شد. پس از بهینه‌سازی شرایط PCR، این روش برای تمام نمونه‌های بالینی انجام و محصول PCR آنها توالی‌یابی شد.

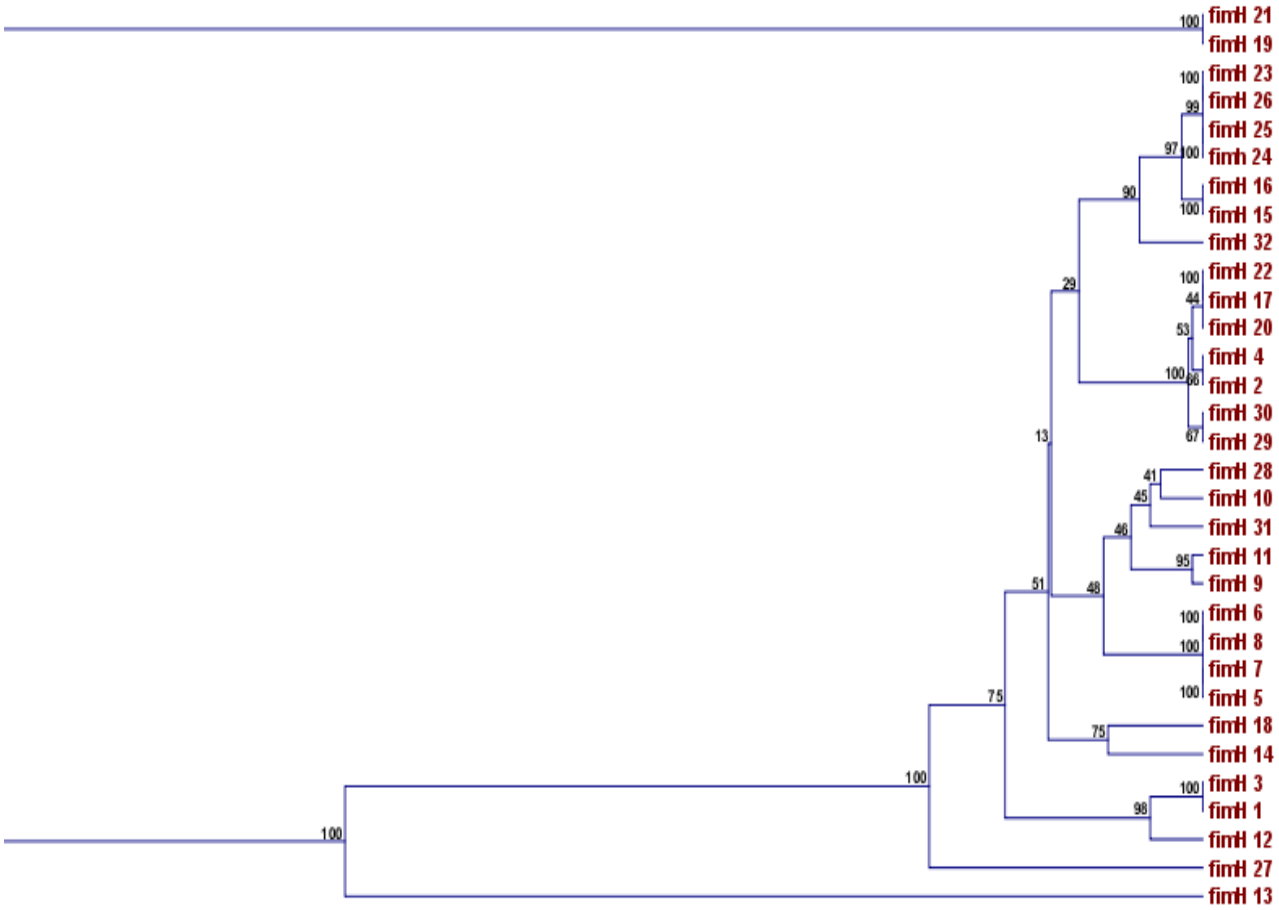
آنالیز توالی‌های ژن *fimH*: پس از دریافت توالی‌ها، برای آنالیز میزان تنوع توالی ژن *fimH*، ابتدا توالی‌های ژن مربوط به ایزوله‌های ادرار و مدفوع هر بیمار جداگانه و با هم همتراز شدند. برای این کار از نرم‌افزار ClustalW استفاده شد. سپس برای آن‌که میزان تنوع توالی

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

*fim*H در نمونه‌های ادرار و مدفوع مشخص شود، توالی‌های این ژن از ایزوله‌های ادرار نیز با هم همتراز شدند و همین کار برای ایزوله‌های مدفوعی نیز با نرم‌افزار MEGA4 انجام شد. در نهایت برای بررسی رابطه فیلوژنی ایزوله‌های ادراری و مدفوعی و رسم درخت فیلوژنی از نرم‌افزار CLC Bio استفاده شد.



شکل ۲) نتیجه همترازی توالی ژن *fim*H در نمونه‌های ادرار با سویه بیماری‌زای UTI89. ایجاد جهش حذفی در ژن *fim*H ایزوله‌های ادراری باعث شده است تا قالب خواندن این ژن تحت تاثیر قرار گیرد.

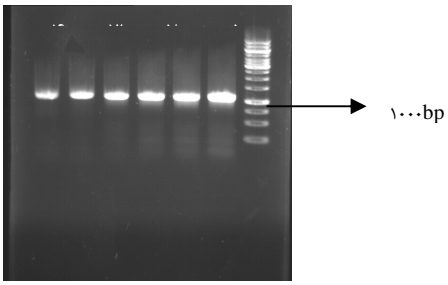


شکل ۳) درخت فیلوژنی مربوط به ایزوله‌های ادراری و مدفوعی

نتایج

شکل ۱ نتیجه الکتروفورز محصول PCR (ژن *fim*H) با آنزیم pfu را روی ژل آگارز ۰/۸٪ نشان می‌دهد.

توالی ژن *fim*H ایزوله‌های ادراری با ژن سویه بیماری‌زای UTI89 با کمک نرم‌افزار MEGA 4 همتراز شد. همان‌گونه که در جدول ۲ نشان داده شده، اختلاف توالی از نوکلئوتید ۸۷ شروع شده است.



شکل ۱) نتیجه الکتروفورز محصول PCR (ژن *fim*H). ستون ۱ مارکر یک کیلوبازی؛ ستون ۲ تا ۷ دماهای اتصال پرایمر به‌ترتیب کاهش دما از ۵۷ تا ۵۲ درجه سانتی‌گراد؛ اندازه مورد نظر bp ۱۰۴۷ بود.

جدول ۲) میزان اختلاف توالی ژن *fim*H در نمونه‌های ادراری با ژن *fim*H سویه بیماری‌زای UTI89. اعداد داخل پرانتز تعداد ایزوله‌هایی را نشان می‌دهد که در آنها اختلاف توالی مشاهده شده است.

ادرار	UTI89	موقعیت نوکلئوتید
(۲) C	G	۸۷
(۶) T	A	۹۳
(۱)T	C	۹۶
(۱)T	C	۱۱۷
(۵)C	T	۱۴۱
(۲)T	C	۱۴۳
(۵)G	A	۱۷۱
(۴)T	C	۲۰۷
(۶)G	A	۲۱۰
(۳)C	T	۲۲۵
(۶)C	T	۲۴۶
(۶)T	G	۲۴۷
(۶)A	G	۲۷۲
(۶)G	A	۲۹۶
(۶)A	T	۳۱۲
(۶)T	C	۳۱۵
(۳)G	T	۳۱۸
(۵)C	T	۳۲۱
(۲)T	C	۳۲۷
(۲)C	G	۳۳۹
(۱)T	C	۳۶۷
(۶)T	G	۳۹۶
(۱)T(۴) ،C	G	۴۱۱
(۶)G	A	۴۱۴
(۱)T	C	۴۱۹
(۳)T	C	۵۳۴
(۱)A	G	۵۶۰
(۱)T	C	۵۸۰
(۳)A	G	۶۰۳
(۱) A(۴) ،T	C	۷۱۴
(۴)A	G	۷۱۷
(۴)A	G	۸۰۷

زمانی که توالی ژن fimH ایزوله‌های ادراری با توالی ژن سویه UTI89 همتراز شد، اختلاف توالی کم بود. اما زمانی که این همترازی برای ایزوله‌های مدفوعی انجام شد، از ابتدای کدونِ شروع تا نوکلئوتید ۶۹، تمام توالی‌های ایزوله‌های مدفوعی مشابه توالی سویه بیماری‌زای UTI89 بودند و در این ناحیه فقط اختلاف توالی در یک سویه مشاهده شد. این در حالی بود که در موقعیت نوکلئوتید ۶۴۶، جهش حذف اتفاق افتاده بود (در ایزوله‌های مدفوعی به‌جز یک مورد) و این جهش سبب شده بود که قالب خواندن پس از آن تغییر کند. شکل ۲ این وضعیت را نشان می‌دهد. درخت فیلوژنی برای بررسی ارتباط ژنتیکی ایزوله‌ها در شکل ۳ آمده است.

بحث

شیوع عفونت‌های ادراری در جوامع مختلف بسیار بالاست. مثلاً در ایالات متحده، ۴۰٪ زنان بزرگسال حداقل یک‌بار تجربه ابتلا به عفونت ادراری را در طول زندگی خود دارند و حدود ۷ میلیون نفر در سال با عفونت ادراری به مراکز درمانی در ایالات متحده مراجعه می‌کنند که بیش از یک میلیارد دلار برای این افراد هزینه می‌شود [۶، ۷]. اشریشیاکلی عامل اصلی عفونت ادراری بوده و علت بیش از ۸۵٪ سیستیت و پیلونفریت حاد، بیش از ۶۵٪ سیستیت‌های عودکننده و علت حداقل ۳۵٪ پیلونفریت عودکننده است. از طرفی مخزن سویه‌های UPEC، فلور مدفوعی است که باکتری به ناحیه مخاطیِ ادراری- تناسلی منتشر شده و به‌صورت بالارونده به مثانه رسیده و به اپی‌تلیالِ ناحیه متصل می‌شود [۸]. پس از اتصال که با واسطه ادهسین‌های پیلی صورت می‌گیرد، باکتری تکثیر یافته و عفونت موضعی سیستیت می‌دهد. درصورتی که باکتری حرکت بالارونده داشته باشد و به بافت کلیه برسد، می‌تواند سبب ایجاد پیلونفریت شود [۹]. یکی از راه‌های کاهش‌دادن و محدودنمودن عفونت‌های حاد ادراری استفاده از آنتی‌بیوتیک است که در حال حاضر سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در حال افزایش‌اند. راهکار دیگر، تهیه واکسن علیه این عفونت‌هاست. از آن‌جایی که مرحله اتصال در کلونیزاسیون و به‌دنبال آن ایجاد عفونت بسیار مهم است، یکی از استراتژی‌های کاربردی، مهار اتصال باکتری است. از این‌رو تهیه واکسنِ حاوی ادهسین‌های سویه‌های UPEC مورد توجه است [۱۰].

یکی از موارد مهم در کاندیدشدن یک پروتئین برای تهیه واکسن این است که در بین ایزوله‌های بیماری‌زا تنوع زیادی نداشته باشد. در بیشتر مطالعاتِ انجام‌شده در مورد تهیه واکسن علیه عفونت ادراری، پروتئین FimH مدنظر بوده است [۱۱، ۱۲]. از آن‌جایی که این پروتئین در سویه‌های کومنسال روده‌ای نیز وجود دارد، بایستی به این نکته توجه کرد که آنتی‌بادی حاصل از تزریق واکسن، اتصال سویه‌های کومنسال را تحت تاثیر قرار ندهد و به عبارت دیگر فلور روده دچار آسیب نشود.

نتیجه‌گیری

ژن *fim*H در بین ایزوله‌های ادراری و مدفوعی دارای تنوع است، به‌طوری که وقتی توالی‌های این ژن در ایزوله‌های ادراری و مدفوعی با توالی ژن موجود در سویه *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن UTI 89 مقایسه شد، نشان داد که شباهت ژن *fim*H در ایزوله‌های ادراری نسبت به سویه UTI 89 بیشتر از شباهت در ایزوله‌های مدفوعی است. این امر مشخص می‌کند که اختلاف توالی ژن *fim*H سبب گرایش متفاوت *اشریشیا کلی* نسبت به اتصال به سلول‌های یوروتلیال می‌شود. نکته قابل توجه دیگر که در این تحقیق به‌دست آمد، این است که در اکثر ایزوله‌های مدفوعی، *جهش* بی‌معنی رخ می‌دهد که به‌دنبال آن سبب بیان پروتئین ناقص می‌شود. البته این *جهش* در قسمت C- ترمینال اتفاق می‌افتد که در اتصال باکتری با واسطه پیلی تیپ ۱ نقشی ندارد. همچنین با رسم درخت فیلوژنی براساس توالی ژن *fim*H در ایزوله‌های ادراری و مدفوعی مشخص شد که در بین ایزوله‌ها، تنوع در حدی است که نمی‌توان آنها را در یک گره قرار داد.

منابع

1- Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity and economic costs. Dis Mon. 2003;49:53-70.

2- Salyers A, Whitt D. Bacterial pathogenesis: A molecular approach. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press; 2002.

3- Klumpp J, Weiser C, Sengupta S, Forrestal G, Batler A, Schaeffer J. Uropathogenic Escherichia coli potentiates type 1 pilus-induced apoptosis by suppressing NF-kB. Infect Immun. 2001;69:6689-96.

4- Krogfelt A, Carsten S, Mark A, Schembri DL, Hasty EV, Sokurenko V, et al. Pathogenic adaptation of Escherichia coli by natural variation of the fimH adhesion. Proc Natl Acad Sci. 1998;95:8922-6.

5- Baron EJ, Finegold SM. Baily and Scott's diagnostic microbiology. 8th ed. Louis: Mosby Company; 2005.

6- Stamm E, Norrby S. Urinary tract infections: Disease panorama and challenges. J Infect Dis. 2001;183:1-4.

7- Rosen DA. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. PLoS Med. 2007;4:329-31.

8- Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli. Exp Mol Pathol. 2008;85:11-9.

9- Wright KJ. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic Escherichia coli depends on type 1 pili. Cell Microbiol. 2007;9:2230-41.

10- Langermann S, Ballou WR. Vaccination utilizing the fimCH complex as a strategy to prevent Escherichia coli urinary tract infection. J Infect Dis. 2001;183(1):84-6.

11- Langermann S, Palaszynski S, Barnhart M, Auguste G, Pinkner JS, Burlein J. Prevention of mucosal Escherichia coli infection by fimH adhesion based systemic vaccination. Science. 1997;276(5312):533.

12- Mysorekar IU, Hultgren SJ. Mechanisms of uropathogenic Escherichia coli persistence and eradication from the urinary tract. Proc Natl Acad Sci. 2006;103(38):14170-5.