

Phenotypic and Genotypic Study of Biofilm Formation in ESBL-Producing *E. coli* strains Isolated from Patients with Colorectal Cancer and Its Relationship with Antibiotic Resistance Patterns

Sadaf Ataei Alamdari¹    , Mohammad Arjomandzadegan^{2*}    , Mona Nassaj Manizani³    , Azam Ahmadi⁴   

1. MSC in Medical Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
2. Professor of Medical Bacteriology, Infectious Diseases Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
3. Assistant Professor of Medical Bacteriology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
4. Associate Professor in Medical Genetics, Infectious Diseases Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received: 2025/06/16

Accepted: 2026/03/11

Abstract

Background: Biofilm formation is one of the most important mechanisms of survival and pathogenicity of *Escherichia coli*, especially in antibiotic-resistant isolates. Beta-lactamase-producing isolates (ESBL) can pose a serious threat to patients with colorectal cancer due to increased drug resistance and the ability to form biofilms. This study aimed to investigate the biofilm production of ESBL isolates and the pattern of drug resistance.

Materials and Methods: A total of 46 stool samples from colorectal cancer patients were collected. The isolates were identified using standard biochemical tests. The production of ESBL was phenotypically identified using the Disk diffusion method according to CLSI guidelines. Phenotypic identification of biofilm was performed using the microtiter plate method. The presence of *fimH* and *Luxs1* genes was assessed using polymerase chain reaction (PCR).

Results: The results showed that 65.2% were capable of forming biofilms. Based on optical density in the microtiter plate test, 19.5% formed strong biofilms, 19.5% formed moderately strong biofilms, and 26% formed weak biofilms. Additionally, 34.7% were unable to form biofilms. In the genotypic analysis using PCR, the *fimH* and *luxs1* genes were evaluated, and the results indicated that a total of 46 isolates possessed the *fimH* and *luxs1* genes.

Conclusion: The results of this study indicated that biofilm formation in ESBL-producing *E. coli* isolates in colorectal cancer patients is common and may play an important role in increasing antibiotic resistance.

***Corresponding Author: Mohammad Arjomandzadegan**

Address: Iran, Arak, basij square, Arak university of medical science

Tel: +9809188602576

E-mail: mmatinam81@yahoo.com

Keywords *Escherichia Coli*, Biofilm, *FimH* Gene, *Luxs1* Gene, Colorectal Cancer.

How to cite this article: Ataei Alamdari S, Arjomandzadegan M, Nassaj Manizani M, Ahmadi A., Phenotypic and Genotypic Study of Biofilm Formation in ESBL-Producing *E. coli* strains Isolated from Patients with Colorectal Cancer and Its Relationship with Antibiotic Resistance Patterns, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2026; 33(1):799-810. DOI: 10.30468/jsums.2026.8144.3272.

Introduction

Biofilm formation represents one of the most significant survival mechanisms among bacterial pathogens, particularly in isolates associated with antibiotic resistance. *Escherichia coli* (*E. coli*), as a leading cause of opportunistic infections in immunocompromised individuals, including cancer patients, is capable of forming biofilms that enhance its resistance to antimicrobial agents and facilitate persistent infections. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *E. coli* isolates are of critical clinical importance due to their ability to hydrolyze a wide range of beta-lactam antibiotics, including third-generation cephalosporins. This resistance, combined with biofilm formation, contributes to treatment failures and increased morbidity and mortality, especially in patients undergoing chemotherapy or radiotherapy for colorectal cancer. Colorectal cancer patients are especially vulnerable due to their immunosuppressive status and frequent hospitalizations, which expose them to nosocomial pathogens. Furthermore, the gastrointestinal tract serves as a reservoir for *E. coli*, making colonization and infection a common phenomenon in these individuals.

Understanding the phenotypic and genotypic characteristics of biofilm-forming ESBL-producing *E. coli* isolates is vital for infection control and the development of effective therapeutic strategies. This study aimed to investigate the ability of ESBL-producing *E. coli* isolated from colorectal cancer patients to form biofilms to evaluate the presence of biofilm-associated genes (*fimH* and *luxS*), and to assess the relationship between biofilm formation and antibiotic resistance profiles.

METHODOLOGY

This cross-sectional study was conducted on 46 stool samples obtained from colorectal cancer patients admitted to a tertiary care hospital. Standard microbiological techniques were

employed for the isolation and identification of *E. coli* isolates. Initial identification was based on colony morphology, Gram staining, and conventional biochemical tests. Phenotypic confirmation of ESBL production was performed using the disk diffusion method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines, with cefotaxime, ceftazidime, and their respective combination disks containing clavulanic acid.

The ability of the isolates to form biofilms was assessed using the microtiter plate assay, a well-established quantitative method based on crystal violet staining. Biofilm formation was categorized as “strong”, “moderate”, “weak”, or “none”, based on the absorbance readings. For genotypic analysis, DNA extraction was carried out using a standard boiling method. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the presence of two biofilm-associated genes: *fimH* (encoding type 1 fimbrial adhesion) and *luxS* (involved in quorum sensing and biofilm regulation). Specific primers were employed, and PCR products were visualized using agarose gel electrophoresis. Antibiotic susceptibility testing for the isolates was also conducted using the Disk diffusion method to identify resistance patterns and evaluate potential correlations with biofilm formation.

RESULTS

Among the 46 ESBL-producing *E. coli* isolates analyzed in this study, 65.2% demonstrated the ability to form biofilms. Based on the optical density values obtained from the microtiter plate assay, 19.5% of the isolates formed strong biofilms, 19.5% formed moderately strong biofilms, and 26% exhibited weak biofilm formation. The remaining 34.7% of the isolates were classified as non-biofilm formers.

PCR analysis revealed that all 46 isolates harbored both the *fimH* and *luxS* genes, indicating a strong genotypic potential for

biofilm formation. Notably, the presence of these genes was observed regardless of the phenotypic biofilm-forming capacity, suggesting that additional regulatory mechanisms may influence gene expression and phenotypic manifestation. Antibiotic susceptibility testing showed a high level of resistance among biofilm-forming isolates compared to non-biofilm formers. The majority of strong biofilm producers exhibited multidrug resistance (MDR), particularly against fluoroquinolones, aminoglycosides, and trimethoprim-sulfamethoxazole. This observation supports the hypothesis that biofilm formation contributes significantly to antimicrobial resistance, likely due to the protective extracellular matrix and the presence of dormant cells within the biofilm structure.

DISCUSSION

The findings of this study emphasize the high prevalence of biofilm formation among ESBL-producing *E. coli* isolates in colorectal cancer patients. The co-existence of ESBL production and biofilm-forming capacity represents a serious therapeutic challenge, particularly in immunocompromised hosts. Biofilms not only hinder the penetration of antibiotics but also enable bacteria to evade host immune responses, facilitating chronic infections.

The universal presence of *fimH* and *luxS* genes among the isolates highlights their potential role in biofilm development. The *fimH* gene is known to mediate the initial attachment of bacteria to epithelial cells and abiotic surfaces, while *luxS* is involved in the synthesis of autoinducer-2 (AI-2), a quorum sensing signal molecule that regulates biofilm maturation. However, the discordance between gene presence and phenotypic expression suggests that biofilm formation is a complex process influenced by multiple environmental and regulatory factors.

The strong association between biofilm formation and antibiotic resistance underscores the importance of considering biofilm-related phenotypes in clinical microbiology.

Traditional susceptibility testing may not adequately reflect the *in vivo* efficacy of antibiotics against biofilm-embedded bacteria. Therefore, incorporating biofilm assessments into routine diagnostic procedures may aid in tailoring more effective treatment regimens.

CONCLUSIONS

In conclusion, this study demonstrates a high prevalence of biofilm formation among ESBL-producing *E. coli* isolated from colorectal cancer patients. The detection of biofilm-associated genes in all isolates indicates a widespread genetic potential for biofilm formation, although phenotypic expression varies. A clear association was observed between biofilm formation and increased antibiotic resistance, highlighting the need for integrated approaches to manage infections caused by such pathogens.

Given the clinical implications, it is crucial to develop targeted strategies for preventing and disrupting biofilms in hospital settings, particularly in oncology wards. Future research should focus on the molecular regulation of biofilm-related genes and explore novel anti-biofilm therapies to combat multidrug-resistant bacterial infections effectively. Understanding the prevalence and molecular basis of biofilm formation in ESBL-producing *E. coli* isolates can guide the implementation of more stringent hygiene practices in oncology units. These practices may include enhanced screening protocols for colonized patients, better disinfection strategies for medical equipment, and improved patient isolation procedures to prevent horizontal gene transfer and cross-contamination.

Moreover, the findings support the integration of molecular diagnostics into routine clinical practice. Rapid detection of biofilm-associated genes such as *fimH* and *luxS* can provide clinicians with early indicators of potential biofilm-related complications, allowing for timely intervention. Incorporating molecular tools in diagnostic laboratories would enhance the speed and accuracy of microbial

characterization, leading to more personalized and effective treatment plans for vulnerable patients.

Furthermore, this research contributes to the growing body of evidence emphasizing the need for alternative therapeutic approaches, such as the use of biofilm-disrupting agents, bacteriophages, or quorum sensing inhibitors. These strategies, either alone or in combination with conventional antibiotics, hold promise in overcoming the limitations posed by biofilm-mediated resistance. Continued research into these areas, along with surveillance of resistance trends, is essential to mitigate the

public health threat posed by multidrug-resistant organisms in cancer care settings.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank the Research Center for Infectious Diseases, Arak University of Medical Sciences, Iran, for funding this project. Without the support of this research center, this work would not have been possible.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

مطالعه فنوتیپی و ژنوتیپی تشکیل بیوفیلم در سویه های E.coli تولید کننده بتالاکتاماز (ESBL) جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال و ارتباط آن با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

صدف عطائی علمداری^۱، محمد ارجمندزادگان^{۲*}، مونا نساج مانیزانی^۳، اعظم احمدی^۴

۱. کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۲. استاد باکتری شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی (IDRC)، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۳. استادیار باکتری شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۴. دانشیار ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی (IDRC)، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۳/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: تشکیل بیوفیلم یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های بقا و پاتوژنسیته اشرشیاکلی به‌ویژه در ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است. ایزوله‌های تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) با افزایش مقاومت دارویی و توانایی تشکیل بیوفیلم می‌توانند تهدید جدی برای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال ایجاد کنند. این مطالعه باهدف بررسی تولید بیوفیلم ایزوله‌های ESBL و الگوی مقاومت دارویی انجام شد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۴۶ نمونه از مدفوع بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال جمع‌آوری شد. ایزوله‌ها با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی استاندارد شناسایی گردیدند. تولید ESBL به روش فنوتیپی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن طبق دستورالعمل CLSI انجام شد. شناسایی فنوتیپی بیوفیلم به روش میکروپلیت انجام شد. حضور ژن‌های fimH و Luxs1 با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ۶۵/۲٪ از نمونه‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم بودند. براساس میزان جذب نوری در آزمون میکروتیتزر پلیت ۱۹/۵٪ بیوفیلم قوی، ۱۹/۵٪ بیوفیلم با شدت متوسط و ۲۶٪ بیوفیلم ضعیف تشکیل دادند. همچنین ۳۴/۷٪ فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم بودند. در بررسی ژنوتیپی با استفاده از روش PCR، ژن‌های fimH و luxs1 مورد ارزیابی قرار گرفتند که ۴۶ ایزوله دارای ژن‌های fimH و luxs1 بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های E.coli تولیدکننده ESBL در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال شایع است و می‌تواند نقش مهمی در افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایفا کند. شناسایی و کنترل این عوامل می‌تواند نقش مهمی در بهبود روند درمان این بیماران داشته باشد.

* نویسنده مسئول: محمد ارجمندزادگان

نشانی: ایران، استان اراک، میدان بسیج، دانشگاه علوم پزشکی اراک
تلفن: +۹۸۰۹۱۸۸۶۰۲۵۷۶
رایانامه: mmatinam81@yahoo.com
شناسه ORCID: 0000-0002-2724-3534
شناسه ORCID نویسنده اول: 0009-0002-6879-759X
DOI: 10.30468/jsums.2026.8144.3272

کلیدواژه‌ها:

اشرشیاکلی، بیوفیلم، ژن fimH، ژن Luxs1، سرطان کولورکتال.

۱. مقدمه

بیوفیلیم (از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی) و الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های E.coli جدا شده از این بیماران وجود دارد. این شکاف دانش، نیاز به بررسی دقیق‌تر مکانیسم‌های مولکولی و فنوتیپی در این ایزوله‌ها را برجسته می‌کند.^[۳] این مطالعه باهدف بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی تشکیل بیوفیلیم در ایزوله‌های E.coli تولیدکننده ESBL جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال و ارزیابی ارتباط آن با الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی انجام شده است. نتایج این پژوهش می‌تواند به درک بهتر نقش بیوفیلیم در شدت عفونت‌های مقاوم و پیشرفت سرطان کولورکتال کمک کرده و راهکارهای درمانی مؤثرتری برای مدیریت عفونت‌ها در این بیماران ارائه دهد.

۲. مواد و روش‌ها

در ابتدا تعداد ۵۰ نمونه مدفوع از بیماران سرطانی جمع‌آوری شد. همه ایزوله‌های E.coli مقاوم به سفالوسپورین‌های نسل سوم (مانند سفوتازیدیم یا سفوتاکسیم) به‌عنوان کاندید برای غربالگری ESBL انتخاب شدند.^[۸] نمونه‌هایی که تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBL) بودند، برای انجام آزمایشات بعدی وارد مطالعه شده و نمونه‌هایی که متعلق به بیماران سرطانی نبوده و ESBL مثبت نبودند، از مطالعه خارج شدند. این مطالعه به‌صورت مقطعی و توصیفی بر روی ۴۶ نمونه بالینی مدفوع با ESBL مثبت از بیماران سرطانی بستری در بیمارستان در ۶ ماهه دوم سال ۱۴۰۳ در مرکز تحقیقات عفونی دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شد. کشت نمونه‌ها بر روی محیط مک‌کانکی آگار (MacConkey agar) انجام شد و ایزوله‌ها با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی استاندارد شناسایی گردید.^[۸]

علائم بالینی بیماران: بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال شرکت‌کننده در این مطالعه عمدتاً دارای علائم بالینی شامل اسهال، کرامپ شکمی، حالت تهوع، استفراغ و تب بودند.

شناسایی باکتری

ایزوله‌های باکتریایی ابتدا بر روی محیط کشت مک‌کانکی آگار کشت داده شدند و کلنی‌های مشکوک به E.coli براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی انتخاب شدند. برای تأیید هویت باکتری، تست‌های بیوشیمیایی استاندارد شامل آزمون اکسیداز (Oxidase test)، تست اکسیداتیو-فرمانتاتیو (OF test)، تست متیل رد (MR)، تست وگس-پروسکائور (VP)، تست هیدرولیز اوره (Urease test)، تست اکسیداز کاتالاز (Catalase test) و تست کاتابولیز قندها (مانند گلوکز، لاکتوز) انجام شد.

Escherichia coli یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های فرصت‌طلب در عفونت‌های بیمارستانی و جامعه است که در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال^۱ (CRC)، به دلیل تغییرات میکروبیوم روده و ضعف ایمنی ناشی از شیمی‌درمانی، نقش مهمی ایفا می‌کند. ایزوله‌های تولیدکننده بتا-لاکتاماز با طیف گسترده^۲ (ESBL) این باکتری به دلیل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، مانند سفالوسپورین‌ها، چالش‌های درمانی قابل توجهی ایجاد کرده‌اند.^[۱] تشکیل بیوفیلیم، به‌عنوان یک مکانیسم کلیدی در پایداری عفونت‌ها، مقاومت E.coli را در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و پاسخ ایمنی میزبان تقویت می‌کند. بیوفیلیم‌ها، که جوامع باکتریایی در ماتریکس پلی‌ساکاریدی هستند، در عفونت‌های مزمن و مرتبط با سرطان کولورکتال، به‌ویژه در ایجاد التهاب و پیشرفت بیماری، نقش دارند.^[۲] بیماران سرطانی به دلیل دیس‌بیوسیس روده و استفاده مکرر از آنتی‌بیوتیک‌ها مستعد عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک هستند.^[۳] تشکیل بیوفیلیم در E.coli تحت تأثیر ژن‌هایی مانند *fimH* و *luxS* قرار دارد. ژن *fimH* که پروتئین‌های چسبنده فیبریل‌های نوع ۱ را کد می‌کند، برای چسبندگی به سلول‌های میزبان و تشکیل بیوفیلیم ضروری است.^[۴] ژن *luxS* که در سیستم کوروم سنسینگ دخیل است، با تولید مولکول‌های خودالقاگر (Autoinducer-2) رفتارهای گروهی باکتری‌ها و تشکیل بیوفیلیم را تنظیم می‌کند.^[۵] ایزوله‌های ESBL اغلب ژن‌های مقاومت مانند *aac(6)-Ib* را حمل می‌کنند که مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون‌ها را القا می‌کند و می‌تواند با بیوفیلیم هم‌افزایی داشته باشد. این ویژگی‌ها در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال که به دلیل نقص ایمنی در معرض عفونت‌های شدید هستند، اهمیت ویژه‌ای دارند.^[۶] بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال به دلیل تغییرات میکروبیوم روده، درمان‌های سرکوب‌کننده ایمنی و استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها، در برابر عفونت‌های ناشی از ایزوله‌های E.coli تولیدکننده ESBL آسیب‌پذیر هستند.^[۷] مطالعات نشان داده‌اند که بیوفیلیم‌های باکتریایی در روده بیماران مبتلا به CRC با افزایش التهاب و تغییرات پروآنکوژنیک مانند کاهش E-cadherin مرتبط هستند.^[۲] بااین‌حال، اطلاعات محدودی درباره ارتباط بین تشکیل

¹ Colorectal cancer

² Extended-spectrum Beta-Lactamases

چاهک‌ها به صفحه جدید منتقل و جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری شد. از ایزوله E.coli ATCC 35218 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.^[۱۲]

شناسایی مولکولی ژن‌های *fimH* و *Luxs1*:

استخراج DNA ژنومی از تمامی جدایه‌های اشرشیا کلی ESB� مثبت با استفاده از کیت استخراج DNA، Favorgen (YTA, Iran, cat. No:) طبق دستورالعمل شرکت سازنده (FATGK 001, Lot. No: CB604121922) انجام شد. غلظت و جذب DNA خالص‌شده در طول موج ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ تعیین شد. غلظت DNA الگوی مورد استفاده بین ۲۰ تا ۵۰ نانوگرم بود و ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرهای forward و reverse به‌صورت جداگانه استفاده شد. برای شناسایی ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم *fimH* و *Luxs1*، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. شرایط چرخه حرارتی شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها طبق دمای مربوطه به مدت ۳۰ ثانیه، طولیل‌سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود (جدول ۱).^[۱۳، ۱۴]

ایزوله‌هایی که نتایج آن‌ها با خصوصیات کلاسیک E.coli مطابقت داشت، به‌عنوان E.coli تأیید شدند.^[۸]

تشخیص تولید ESB�

تعیین تولیدکنندگی ESB� توسط روش‌های ترکیبی دیسک دیفیوژن مطابق با دستورالعمل‌های CLSI^۱ انجام شد. به‌طور خلاصه، حساسیت ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم) و سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) به‌تنهایی و همراه با کلولانیک اسید (۳۰/۱۰) مورد بررسی قرار گرفت. افزایش حداقل ۵ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد در حضور کلولانیک اسید نسبت به آنتی‌بیوتیک تنها، مثبت بودن تولید ESB� را نشان داد.^[۹] همچنین به منظور تأیید نتایج فنوتیپی، شناسایی ژن bla-CTX-M به روش PCR انجام شد.^[۱۰] از سویه E.coli ATCC 35218 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.^[۱۱]

بررسی فنوتیپی بیوفیلم:

تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش میکروتیتر پلیت (Microtiter Plate Assay) ارزیابی شد. هر ایزوله در ۵ میلی‌لیتر محیط Tryptic Soy Broth (TSB) حاوی ۱٪ گلوکز، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه (shaking) انکوبه شد. سپس، سوسپانسیون باکتریایی به میزان نیم مک‌فارلند تنظیم و جذب نوری آن در طول موج ۶۲۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری معادل 10^7 CFUs به ۹۰۰ میکرولیتر محیط TSB حاوی ۱٪ گلوکز استریل اضافه شد. درنهایت، ۲۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون معادل 2×10^6 CFUs به چاهک‌های صفحه میکروتیتر منتقل گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۷۵ دور در دقیقه انکوبه شد. پس از انکوباسیون، محتویات چاهک‌ها تخلیه و سه بار با محلول نرمال سالین شسته شده و اجازه داده شد تا خشک شوند. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر متانول به منظور ثابت کردن بیوفیلم به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه باقی گذاشته شد. پس از این زمان، متانول تخلیه و چاهک‌ها خشک شدند. در مرحله بعد، ۲۰۰ میکرولیتر محلول کریستال ویوله ۰/۰۵٪ به چاهک‌ها افزوده شد و به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. سپس کریستال ویوله تخلیه و چاهک‌ها سه بار با نرمال سالین شسته شده و خشک شدند. درنهایت، ۲۰۰ میکرولیتر اتانول به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد همراه با shaking قرار گرفت. سپس محلول داخل

¹ Clinical and Laboratory Standards Institute

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

Refer- ence	دمای Annealing(°C)	اندا زه	پرایمر معکوس	پرایمر رو به جلو	ژن هدف
[۱۳]	58	20 4bp	5'- AGGTTTGGCTTTTCGCACAA -3'	5'- AATTGCCGTGCTTATTTTGC-3'	fi mH
[۱۴]	58	17 9bp	5'- CAGCAAACAAGTGCTCCAGG- 3'	5'- TACCGGAGGTGGCTAAATGC-3'	L uxs1
[۱۰]	58	54 4 bp	5'- CGATATCGTTGGTGGTGCCAT -3'	5'- TTTGCATGTGCAGTACCAGTAA -3'	Bl a- CTX- M

جدول ۲: محدوده مورد نیاز برای محاسبه بیوفیلیم

بدون چسبندگی	چسبندگی ضعیف	چسبندگی متوسط	چسبندگی قوی
$OD \leq OD_c$	$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	$4 \times OD_c < OD$
OD: optical density OD _c : cut-off OD Value: OD595nm			

فرگمنت‌های تولیدی از PCR توسط دستگاه آنالایزر ژنتیکی ABI تعیین توالی شدند. همچنین داده‌های توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزارهای Chromas, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), MEGA 4.0 تجزیه و تحلیل شدند.

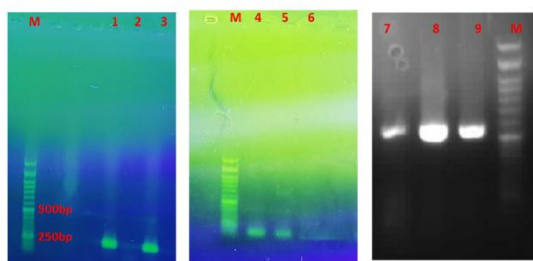
۳. نتایج

بررسی فنوتیپی تشکیل بیوفیلیم در ۴۶ ایزوله ESBL به صورت میانگین جذب نوری (OD) محاسبه شد. تفسیر توانایی تشکیل بیوفیلیم براساس روش تعیین حد آستانه (Cut-off OD) صورت گرفت؛ به طوری که حد آستانه (OD_c) برابر با میانگین جذب نوری (OD) کنترل منفی + ۳ برابر انحراف معیار آن محاسبه می‌شود. براین اساس، جدایه‌ها به ۳ گروه قوی، متوسط، ضعیف و منفی از نظر توانایی تشکیل بیوفیلیم طبقه بندی گردیدند (جدول ۲) [۱۵]. نتایج نشان داد که ۳۰ ایزوله (۶۵/۲۳٪) قادر به تشکیل بیوفیلیم بودند. براساس میزان جذب نوری در آزمون میکروتیتر پلیت، ۹ ایزوله (۱۹/۵۷٪) بیوفیلیم قوی، ۹ ایزوله (۱۹/۵۷٪) بیوفیلیم با شدت متوسط و ۱۲ ایزوله (۲۶/۰۹٪) بیوفیلیم ضعیف تشکیل دادند. همچنین ۱۶ ایزوله (۳۴/۷۷٪) فاقد توانایی تشکیل بیوفیلیم بودند (جدول ۳). این یافته‌ها بیانگر شیوع قابل توجه توانایی تشکیل بیوفیلیم در بین ایزوله‌های ESBL جدا شده از بیماران سرطانی است.

جدول ۳: توزیع شدت تشکیل بیوفیلیم در ایزوله‌های ESBL

درصد (%)	تعداد (n)	جدایه‌ها	شدت تشکیل بیوفیلیم
۱۹/۵۷	۹	قوی (Strong)	شدت تشکیل بیوفیلیم
۱۹/۵۷	۹	متوسط (Moderate)	متوسط
۲۶/۰۹	۱۲	ضعیف (weak)	ضعیف
۳۴/۷۷	۱۶	منفی (Negative)	منفی

نتایج PCR نشان داد که تمامی ایزوله‌ها از نظر حضور ژن‌های fimH و luxS1 مثبت بودند؛ اما نتایج فنوتیپی تشکیل بیوفیلیم نشان داد که تنها حدود ۶۵٪ از ایزوله‌ها توانایی تشکیل بیوفیلیم داشتند (شکل ۱).



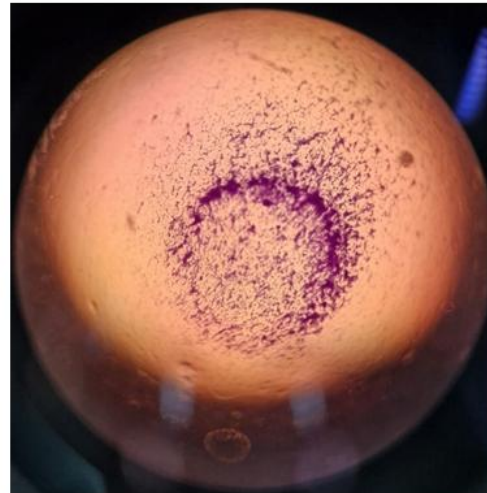
شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR

به ترتیب از سمت چپ

ژن‌های fimH روی ژل آگارز ۱٪، لدر 50bp M، ستون‌های ۱ و ۳ نمونه‌های مثبت با باند 204bp بازی و ستون ۲ کنترل منفی

(آب دیونیزه).

وسط ژن Luxs1، لدر 50bp M، ستون‌های ۴ و ۵ نمونه مثبت با باند 179bp و ستون ۶ کنترل منفی (آب دیونیزه) سمت راست ژن bla-CTX-M سویه E.coli ATCC 35218 M، لدر 50bp، ستون ۷، ۸ و ۹ نمونه مثبت با باند 544bp



شکل ۲: نمای میکروسکوپی بیوفیلم قوی تشکیل شده توسط ایزوله E.coli دارای ESBL جدا شده از بیمار مبتلا به سرطان، رنگ آمیزی شده با کریستال ویوله (بزرگنمایی ۱۰۰×)

۴. بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ۶۵/۲٪ از ایزوله‌های E.coli تولیدکننده ESBL قادر به تشکیل بیوفیلم بودند که از این میان ۱۹/۵٪ قوی، ۱۹/۵٪ متوسط و ۲۶٪ بیوفیلم ضعیف تشکیل دادند. این یافته‌ها با نتایج مطالعه‌ای که نشان داد ۶۱/۹٪ از ایزوله‌های E.coli تولیدکننده ESBL بیوفیلم تولید می‌کنند، همخوانی دارد [۱۶]. نتایج مطالعه نوری و همکاران انجام شد، تنها ۳۶/۹٪ از ایزوله‌های E.coli جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال توانایی تشکیل بیوفیلم داشتند که ۳۳/۳٪ از آن‌ها بیوفیلم متوسط تا قوی و ۶۶/۶٪ بیوفیلم ضعیف تولید کردند [۱۷]. مطالعه Hatayama و همکاران نشان داد که ۷۰٪ از ایزوله‌های E.coli های ESBL مثبت قادر به تولید بیوفیلم بودند [۱۸]. در یک مطالعه متاآنالیزی که به بررسی ارتباط بین تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های E.coli پرداخته شد؛ ۷۴/۴٪ از ایزوله‌ها بیوفیلم‌ساز بودند و از این میان ۲۸/۶٪ قوی، ۳۵/۲٪ متوسط و ۳۸/۶٪ بیوفیلم ضعیف تشکیل دادند [۱۹]. مطالعه Raskov و همکاران

اولین بار تشکیل بیوفیلم را نه تنها روی اپی‌تلیوم سطحی کولون، بلکه در عمق کریپت‌ها در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال با استفاده از پروب PNA-FISH بررسی کرد. نتایج آن‌ها نشان داد بیوفیلم‌ها در کریپت‌های کولون بیماران CRC رشد می‌کند که منجر به تسریع کارسینوژنز از طریق نفوذ در عمق اپی‌تلیال، التهاب و جهش‌های مضر می‌گردد [۲۰]. در پژوهشی که توسط Zhang و همکاران روی ۳۲۴ بیمار سرطانی که دچار عفونت خونی با E.coli بودند، حدود ۴۴٪ از ایزوله‌های E.coli توانایی تشکیل بیوفیلم داشتند و درصد زیادی از این ایزوله‌ها مولد ESBL بودند. همچنین مرگ‌ومیر ۹۰ روزه در بیمارانی که ایزوله بیوفیلم‌ساز داشتند به‌طور معناداری بیشتر بود [۲۱]. در بررسی ژنوتیپی با استفاده از روش PCR در مطالعه حاضر، ژن‌های fimH و luxs1 مورد ارزیابی قرار گرفتند که در مجموع ۴۶ ایزوله دارای ژن‌های fimH و luxs1 بودند.

این ژن‌ها از طریق مکانیسم‌های چندگانه، نه تنها فرایند چسبندگی اولیه باکتری به سطوح اپیتلیال را تسهیل می‌کنند، بلکه با تنظیم تولید ماتریکس خارج سلولی (EPS^۱) و ایجاد ساختارهای سه‌بعدی پایدار، محیطی محافظتی در برابر عوامل ضد میکروبی ایجاد می‌نمایند [۲۲، ۲۳]. ژن fimH که کدکننده فیمبریه نوع ۱ است، با اتصال به گلیکوپروتئین‌های میزبان مانند CEACAM6 (CD66c) روی سلول‌های اپیتلیال روده، امکان استقرار اولیه باکتری و نفوذ به لایه مخاطی را فراهم می‌سازد. این تعامل، خاصیت چسبندگی را افزایش داده و تشکیل بیوفیلم را تسریع می‌کند؛ به گونه‌ای که مطالعات نشان می‌دهند مهار fimH با آنتاگونیست‌های اختصاصی می‌تواند تشکیل بیوفیلم را تا ۷۰٪ کاهش دهد [۲۲]. در مطالعه زارعی و همکاران حضور قوی ژن fimH در ایزوله‌های CRC در مقایسه با IBD و افراد سالم مشاهده شد؛ به طوری که fimH بیشترین شیوع (۸۲٪) را در ایزوله‌های CRC داشت [۲۴]. نتایج پژوهش Jin و همکاران که توالی‌سنجی ژن fimH در ایزوله‌های E.coli در مدفوع بیماران CRC را بررسی کردند، نشان داد وجود جهش‌های خاص در Mannose-binding fimH موجب افزایش سرطان‌زایی در مدل موشی می‌شود و حذف ژن fimH توانایی تومورزایی را کاهش می‌دهد [۲۵]. مطالعه‌ای روی E.coli ایزوله

^۱ Extracellular Polymeric Substances

MG1655 باهدف مشاهده جهش‌هایی که منجر به افزایش چسبندگی و بیوفیلم سازی قوی‌تر می‌شدند انجام شد. نتایج نشان داد که ایزوله‌های جهش‌یافته، بیوفیلم قوی‌تری نسبت به ایزوله‌های اولیه تشکیل دادند^[۲۶]. از سوی دیگر، ژن luxS به‌عنوان بخشی از سیستم کوروم سنسینگ (QS) مسئول سنتز مولکول‌های سیگنالینگ خودالقا (AI-2) است که هماهنگی بین سلولی در تشکیل بیوفیلم و بیان فاکتورهای ویروالانس را تنظیم می‌کند. فعال‌شدن این سیستم منجر به افزایش تولید پلی‌ساکاریدهای ماتریکس خارج سلولی و تشدید مقاومت ذاتی بیوفیلم‌ها در برابر نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. پژوهش‌ها حاکی از آن است که مهار انتخابی luxS با ترکیباتی مانند بربرین، بیان ژن‌های مرتبط با بیوفیلم (pfS و motA) را سرکوب کرده و مورفولوژی سلولی را به‌طور قابل‌توجهی تغییر می‌دهد؛ این تغییرات نه‌تنها ساختار بیوفیلم را مختل می‌کند، بلکه حساسیت باکتری را به عوامل ضد میکروبی افزایش می‌دهد^[۲۳]. در مطالعه‌ای که روی ژن luxS در باکتری E.coli (نوع مقاوم به کاربایم) انجام شد، نتایج نشان داد باکتری‌هایی که دارای ژن luxS بودند بیوفیلم قوی‌تری ساختند، مقاومت بیشتری به داروها داشتند و میزان التهاب (IL-6) در بدن میزبان بیشتر بود. در مقایسه باکتری‌هایی که ژن LuxS در آن‌ها خاموش بود، بیوفیلم ضعیف داشتند و باکتری‌ها راحت‌تر از بین رفتند و التهاب کاهش پیدا کرد^[۲۷]. پژوهشی باهدف بررسی تأثیر حذف ۳ ژن کلیدی fimH، LuxS و bola در ایزوله آزمایشگاهی E.coli ATCC 25922P روی کاهش بیوفیلم‌سازی انجام شد. پژوهشگران با استفاده از CRISPER/Cas9 این ژن‌ها را حذف کرده و با qPCR به تأیید رسیدند. میزان بیوفیلم با آزمون کریستال ویوله اندازه‌گیری شد و کاهش قابل‌توجه بیوفیلم در این ایزوله‌ها مشاهده شد^[۱۴]. در مطالعه حاضر ارتباط مستقیمی بین توانایی تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های موردبررسی مشاهده شد. بیوفیلم‌های بالغ با ایجاد سد فیزیکی-شیمیایی، نفوذپذیری بتا-لاکتام‌ها را کاهش داده و هم‌زمان با ترشح بتا-لاکتام‌های وسیع‌الطیف (ESBLs) تخریب داروها را تسریع می‌کنند^[۲۲،۲۸]. برای مثال در پژوهشی که روی ۶۱ ایزوله بالینی اشرشیاکلی مربوط به عفونت مجاری ادراری انجام شد، تقریباً ۷۵٪ ایزوله‌ها مولد ESBL بودند و ۹۳٪ ایزوله‌ها قادر به

تشکیل بیوفیلم بودند. همچنین ایزوله‌هایی با تیپ FimH30/ST131 زیرگروه قوی بیوفیلم‌ساز بودند^[۲۹]. در مطالعه‌ای دیگر، ۱۰۹ ایزوله کلینیکی شامل ESBL و AmpC بررسی شدند. نتایج نشان داد ۸۳٪ ایزوله‌ها بیوفیلم‌ساز قوی هستند. از این گروه ۶۲٪ ESBL مثبت، بیوفیلم قوی ساختند^[۳۰]. علاوه‌براین، تراکم بالای سلولی در بیوفیلم، انتقال افقی ژن‌های مقاومت از طریق پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها را تسهیل می‌کند که این پدیده در محیط‌های بیمارستانی به‌عنوان یک چالش جدی در درمان عفونت‌های فرصت‌طلب محسوب می‌شود^[۲۸]. مطالعات مولکولی نشان می‌دهند که بیان هم‌زمان ژن‌های fimH و luxS فعال‌شدن مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با استرس اکسیداتیو را تحریک کرده و بقای باکتری در برابر دفاع میزبان و آنتی‌بیوتیک‌ها را افزایش می‌دهد^[۲۳]. در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال، ضعف سیستم ایمنی ناشی از شیمی‌درمانی و تخریب بافت روده، شرایط ایده‌آلی برای استقرار بیوفیلم‌های باکتریایی فراهم می‌کند. تجمع بیوفیلم‌ها در این بیماران نه‌تنها خطر عفونت‌های سیستمیک را افزایش می‌دهد، بلکه با ایجاد التهاب موضعی، پیشرفت تومور را نیز تسریع می‌نماید^[۲۲]. این یافته‌ها اهمیت هدف‌گیری هم‌زمان مکانیسم‌های تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنزیمی را در رویکردهای درمانی جدید برجسته می‌سازد. به‌عنوان مثال، استفاده از ترکیبات مهارکننده کوروم سنسینگ (مانند بربرین) در کنار آنتی‌بیوتیک‌های غیر بتا-لاکتام (مثل فلوروکینولون‌ها) می‌تواند اثربخشی درمانی را بهبود بخشد^[۲۳]. همچنین، به‌کارگیری نانوذرات حاوی یون‌های روی (ZnO) به دلیل خاصیت ضد بیوفیلم و القای آپوپتوز باکتریایی، گزینه امیدوارکننده‌ای برای مطالعات آینده است^[۲۸،۳۱]. بنابراین غربالگری ایزوله‌های بالینی از نظر حضور هم‌زمان ژن‌های fimH و luxS می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر پیش‌آگهی برای عفونت‌های مقاوم در بیماران سرطانی مورد استفاده قرار گیرد. توسعه واکسن‌های چندظرفیتی هدفمند علیه فیمبریه‌های نوع ۱ و پروتئین‌های مرتبط با کوروم سنسینگ، به همراه استراتژی‌های مهار آنزیم بتا-لاکتاماز، می‌تواند راهبردهای نوینی در کنترل این عفونت‌ها ارائه دهد. با وجود نتایج ارزشمند به‌دست آمده از این مطالعه محدودیت‌هایی از جمله حجم نمونه محدود، عدم انجام

PFGE یا MLST برای بررسی اپیدمیولوژیک ایزوله‌ها و محدودیت بودجه وجود داشت.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از حمایت‌های معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک تقدیر و تشکر می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی:

این مطالعه با کد اخلاق ID IR.ARAKMU.REC.1403.047 به تصویب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک رسیده است.

سهم نویسندگان:

صدف عطائی: انجام عملی طرح و نوشتن متن مقاله

محمد ارجمندزادگان: ویراستاری و مدیریت طرح

مونا نساج: مشاور در آزمایش‌های میکروبیولوژی

اعظم احمدی: مشاور در آزمایش‌های مولکولی

حمایت مالی:

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی تأییدشده در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک (کد ۴۴۲۹) می‌باشد.

تضاد منافع:

نویسندگان اظهار کردند که تضاد منافی برای پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

- [1]. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*. 2005;18(4):657-86.
- [2]. Dejea CM, Fathi P, Craig JM, Boleij A, Taddese R, Geis AL, et al. Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science*. 2018;359(6375):592-7.
- [3]. Jian C, Yinhang W, Jing Z, Zhanbo Q, Zefeng W, Shuwen H. *Escherichia coli* on colorectal cancer: A two-edged sword. *Microbial Biotechnology*. 2024;17(10):e70029.
- [4]. Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, et al. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of applied microbiology*. 2016;121(2):309-19.
- [5]. Deng Z, Hou K, Valencak TG, Luo XM, Liu J, Wang H. AI-2/LuxS quorum sensing system promotes biofilm formation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and enhances the resistance to enterotoxigenic *Escherichia coli* in germ-free zebrafish. *Microbiology spectrum*. 2022;10(4):e00610-22.
- [6]. Wong MH, Chan EW, Liu LZ, Chen S. PMQR genes *oqxAB* and *aac* (6) *Ib-cr* accelerate the development of fluoroquinolone resistance in *Salmonella typhimurium*. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:521.
- [7]. Liu C, Li Z, Ding J, Zhen H, Fang M, Nie C. Species-level analysis of the human gut microbiome shows antibiotic resistance genes associated with colorectal cancer. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:765291.
- [8]. procop GW; Church DL; Hall GS; Janda WM; Schreckenberger PC; Woods GL. e. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2017.
- [9]. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI supplement M100. 35th ed. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2025.
- [10]. Gonzales E, Patiño L, Ore E, Martínez V, Moreno S, Cruzado NB, et al. β -lactamasas de espectro extendido tipo CTX-M en aislamientos clÁnicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en el Instituto Nacional de Salud del Niño-Breña, Lima, Perú. *Revista Medica Herediana*. 2019;30(4):242-8.
- [11]. Ariyanti T, Suhaemi S, Mulyati S, Sukatma S, Sumirah S, Noor SM, et al. Dissemination and phenotypic characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* in Indonesia. *Open Veterinary Journal*. 2025;15(3):1340.
- [12]. Mirzaei R, Yousefimashouf R, Arabestani MR, Sedighi I, Alikhani MY. The issue beyond resistance: Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is induced by subinhibitory concentrations of cloxacillin, cefazolin, and clindamycin. *PLoS One*. 2022;17(11):e0277287.
- [13]. Abdul Raheem Hasan S, Sajid Al-Jubori S, Abdul Sattar Salman J. Molecular Analysis of *fimA* Operon Genes among UPEC Local Isolates in Baghdad City. *Archives of Razi Institute*. 2021;76(4):829-40.
- [14]. Alshammari M, Ahmad A, AlKhulaifi M, Al Farraj D, Alsudir S, Alarawi M, et al. Reduction of biofilm formation of *Escherichia coli* by targeting quorum sensing and adhesion genes using the CRISPR/Cas9-HDR approach, and its clinical application on urinary catheter. *Journal of Infection and Public Health*. 2023;16(8):1174-83.
- [15]. Bakhshi M, Jamali H. Evaluating the Biofilm Ability by Microtiter Plate Method in Uropathogenic *Escherichia Coli* Isolated from Patients with Urinary Tract Infection with Urinary Stones. *Armaghane Danesh*. 2020;25(4):474-86.
- [16]. Surgers L, Boyd A, Girard P-M, Arlet G, Decré D. Biofilm formation by ESBL-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Medical Microbiology*. 2019;309(1):13-8.
- [17]. Nouri R, Hasani A, Masnadi Shirazi K, Alivand MR, Sepehri B, Sotoudeh S, et al. Mucosa-Associated *Escherichia coli* in Colorectal Cancer Patients and Control Subjects: Variations in the Prevalence and Attributing Features. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2021;2021(1):2131787.
- [18]. Hatayama N, Sato Y, Tahira R, Hori T, Tansho-Nagakawa S, Ono Y, et al. Cefmetazole, flomoxef, and meropenem are effective against planktonic cells but not biofilms of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *BMC Microbiol*. 2025;25(1):387.
- [19]. Garousi M, Tabar SM, Mirazi H, Asgari P, Sabeghi P, Salehi A, et al. A global systematic review and meta-analysis on correlation between biofilm producers and non-biofilm producers with antibiotic resistance in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*. 2022; 164:105412.

- [20]. Raskov H, Kragh KN, Bjarnsholt T, Alamili M, Gögenur I. Bacterial biofilm formation inside colonic crypts may accelerate colorectal carcinogenesis. *Clinical and translational medicine*. 2018;7(1):30.
- [21]. Zhang Q, Gao H-Y, Li D, Li Z, Qi S-S, Zheng S, et al. Clinical outcome of *Escherichia coli* bloodstream infection in cancer patients with/without biofilm formation: a single-center retrospective study. *Infection and drug resistance*. 2019:359-71.
- [22]. Dumych T, Yamakawa N, Sivignon A, Garenaux E, Robakiewicz S, Coddeville B, et al. Oligomannose-rich membranes of dying intestinal epithelial cells promote host colonization by adherent-invasive *E. coli*. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:742.
- [23]. Sun T, Li X-D, Hong J, Liu C, Zhang X-L, Zheng J-P, et al. Inhibitory effect of two traditional Chinese medicine monomers, berberine and matrine, on the quorum sensing system of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:2584.
- [24]. Zarei O, Arabestan MR, Majlesi A, Mohammadi Y, Alikhani MY. Determination of virulence determinants of *Escherichia coli* strains isolated from patients with colorectal cancer compared to the healthy subjects. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*. 2019;12(1):52.
- [25]. Jin Y, Tang S, Li W, Ng SC, Chan MW, Sung JJ, et al. Hemolytic *E. coli* promotes colonic tumorigenesis in females. *Cancer research*. 2016;76(10):2891-900.
- [26]. Yoshida M, Thiriet-Rupert S, Mayer L, Beloin C, Ghigo J. Selection for nonspecific adhesion is a driver of FimH evolution increasing. *Escherichia coli*. 2022.
- [27]. Xu X, Cai M, Lai H, Lian S, Hu L, Cao Y. Characterization of AI-2/LuxS quorum sensing system in antibiotic resistance, pathogenicity of non carbapenemase-producing carbapenem-resistant *Escherichia coli*. *BMC microbiology*. 2025;25(1):140.
- [28]. Compaoré M, Kiendrebeogo M. Free radical scavenging capacity and anti-biofilm potentiality of six wild edible fruits from Burkina Faso. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2018;7(9):2085-93.
- [29]. Aydın E, Kocaaga M, Temel A. Association of antibiotic resistance and biofilm formation in *Escherichia coli* ST131/O25b. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*. 2024;71(3):197-205.
- [30]. Gebremariam T, Eguale T, Belay T, Kalayu AA, Abula T, Engidawork E, et al. Antibiotic Resistance, and Biofilm Forming Characteristics of *Escherichia coli* Clinical Isolates at a Hospital in Tigray, Northern Ethiopia. *Cureus*. 2024;16(11).
- [31]. Tirono M, Suhariningsih RA, Yasin M, Gunawan A. Combination model of electric field and light for deactivation biofilm bacteria. *Instrumentation Measure Metrologie*. 2018;17(1):153-65.