

ارزیابی ژن‌های کد کننده سیستم‌های جذب آهن در جدایه‌های اشریشیاکلی انترواگریگیتو (چسبنده‌ی روده‌ای) EAEC جدا شده از نمونه‌های اسهالی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۰۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۲۰

خلاصه

مقدمه

اغلب اشریشیاکلی‌ها بیماریزا نیستند. ولی بعضی از سویه‌های *E. Coli* با کسب و سنتز ژن‌های حدت متنوع بیماریزا می‌گردند. آهن یک ماده مغذی ضروری، نقش مهمی در بیماریزایی *E.coli* دارد. یکی از عملکردهای میکروارگانیسم‌ها در شرایط پایین بودن آهن آزاد تولید سیدروفورهاست. سیدروفورها به عنوان عوامل جذب کننده آهن خارج سلولی از مواد معدنی یا ترکیبات آلی در شرایط فقدان آهن عمل می‌کنند. هدف از این مطالعه شناسایی و ارزیابی ژن‌های کد کننده سیستم‌های جذب آهن در جدایه‌های اشریشیاکلی چسبنده روده‌ای جدا شده از نمونه‌های اسهال می‌باشد.

روش کار

در این مطالعه سه پانل طراحی شد. پانل ۱: *fecA*, *iutA*, *iron*؛ پانل ۲: *irp2*, *sitA*, *fyuA* و پانل ۳: *iucD*. که در پانل ۱ و ۲ از روش Triplex-PCR و پانل ۳ از روش Single-PCR استفاده گردید و ۴۴ جدایه‌ی EAEC جدا شده از نمونه‌های اسهال توسط این سه پانل غربالگری شد.

نتایج

نتایج نشان داد که در مجموع ۴۴ جدایه EAEC به ترتیب بیشترین فراوانی مربوط به ژن‌های *fecA* (۱۰۰٪)، *fyuA* (۹۷/۷۳٪)، *irp2* (۴۳٪)، *iutA* (۹۵/۴۵٪)، *iucD* (۷۷/۲۷٪)، *sitA* (۶۵/۹۱٪) و *iron* (۹/۰۹٪) بود و ۷ پروفایل ژن‌های کد کننده سیستم‌های مختلف جذب آهن شناسایی گردید.

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که جدایه‌های EAEC در شرایط پایین بودن آهن آزاد توانایی تولید انواع سیدروفورها را دارند و جهت دریافت آهن مورد نیازشان از تنوع پروفایل سیستم‌های مختلف جذب آهن استفاده می‌کنند.

کلمات کلیدی

اشریشیاکلی چسبنده روده‌ای، سیدروفور، جذب آهن، اسهال، Triplex-P

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

زکيه ایمان پناه^{*۱}

غلامرضا هاشمی تبار^۱

مهدي عسكري بدوئي^۱

کیارش قزوینی^۲

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی

مشهد، مشهد، ایران

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد،

ایران

Email: golkar34@gmail.com

مقدمه

اشریشیاکلی معمولاً ظرف چند ساعت پس از تولد، در دستگاه گوارش نوزاد انسان کلونیزه می‌شود. معمولاً *E. coli* و میزبان انسانی آن برای چندین دهه با منافع متقابل (همیاری) همزیستی دارند. سویه‌های *E. coli* کم‌نسب به ندرت باعث بیماری می‌شوند، به جز در میزبان‌های دارای نقص ایمنی یا وقتی که سد گوارشی نرمال شکسته می‌شود، برای مثال در پرتونیت. *E. coli* کم‌نسب در لایه مخاطی روده بزرگ پستانداران وجود دارد. این باکتری فراوان‌ترین بی‌هوازی اختیاری میکرو فلور روده انسان را تشکیل می‌دهد. عفونت‌های ناشی از *E. coli* بیماری‌زا ممکن است به سطوح مخاطی محدود شود یا در سراسر بدن منتشر شود. سه سندرم بالینی عمومی می‌تواند ناشی از عفونت با یکی از این پاتوتیپ‌ها ایجاد شود: (۱) عفونت دستگاه اداری، (۲) سپسیس/مننژیت، و (۳) بیماری روده/اسهالی (۱). سویه‌های *E. coli* بیماری‌زا براساس نحوه ایجاد بیماری به دو گروه تقسیم بندی می‌شوند: سویه‌های که قادر به ایجاد بیماری در خارج از دستگاه گوارش^۱ ExPEC هستند و سویه‌های که قادر به ایجاد بیماری در داخل دستگاه گوارش^۲ IPEC هستند. *E. coli* مولد اسهال^۳ (DEC) در نظر گرفته می‌شوند، که خود به هفت پاتوتیپ^۴ مختلف قابل تقسیم بندی هستند: انتروتوکسینیک^۵ اشریشیاکلی (توکسین زای روده‌ای) (ETEC)، انترواینویسیو اشریشیاکلی (مهاجم روده‌ای) (EIEC)، دو زیر گروه تیپیکال^۶ و آتیپیکال^۷ شیکاگوکسین اشریشیاکلی (STEC)، انتروپاتوژنیک اشریشیاکلی (بیماری‌زای روده‌ای) (EPEC)، انترواگریگیتو اشریشیاکلی (چسبنده‌ای روده‌ای) (EAEC)، دیفیوز ادهرنت اشریشیاکلی (با چسبندگی پراکنده) (DAEC)، ادهرنت اینویزیو اشریشیاکلی (چسبنده-مهاجم) AIEC^۸ (۲-۵). اشریشیاکلی

چسبنده‌ی روده‌ای برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ از یک کودک مبتلا به اسهال حاد در لیما، پرو جداسازی شد و به عنوان عامل بیماری اسهال در کشورهای در حال توسعه و (اخیراً) در کشورهای صنعتی شناخته شده است (۶). یکی از فاکتورهای مهم در بیماری زایی اشریشیاکلی سیستم‌های جذب آهن است. آهن یک عنصر ضروری برای بسیاری از فعالیت‌های این باکتری از جمله سنتز DNA و RNA، تثبیت ازت، چرخه کربو کسلیک اسید، انتقال الکترون و تحریک تولید سیدروفور است. باکتری‌ها حدوداً 10^6 mol/L آهن یا بیشتر برای حمایت از رشد و تولید مثل خود نیاز دارند. آهن در انسان در داخل گلبول‌های قرمز به شکل هموگلوبین و در سرم و ترشحات در ترکیب با گلیکوپروتئین‌هایی نظیر ترانسفرین و لاکتوفرین وجود دارد (۷-۸). لذا آهن به صورت آزاد در دسترس باکتری‌ها نمی‌باشد و برای جذب آهن و در شرایط کمبود آهن ترکیبات کلاته‌کننده آهن نظیر سیدروفورها توسط باکتری‌ها ایجاد می‌شود. که به علت تمایل بالا، آهن را از گلیکوپروتئین‌های فوق جذب می‌کنند (۹). سیدروفورها ترکیباتی با وزن مولکولی کم و میل ترکیبی بالا هستند که در باکتری‌های مهاجم به منظور مقابله و رقابت با حامل‌های فیزیولوژیک آهن در بدن انسان و حیوانات مانند ترانسفرین، لاکتوفرین و فریتین (آهن داخل سلولی) شکل گرفته اند. بنابراین سیدروفورها به عنوان عوامل جذب کننده آهن خارج سلولی از مواد معدنی یا ترکیبات آلی در شرایط فقدان آهن عمل می‌کنند. سیدروفورها توسط میکروارگانیسم‌ها سنتز می‌شوند و به محیط اطراف ترشح می‌شوند و با آهن فریک (Fe^{۲+}) کمپلکس تشکیل می‌دهند. باکتری‌ها از سیدروفورهای خود و همچنین آنهایی که توسط سایر گونه‌های باکتریایی یا حتی قارچ‌ها سنتز می‌شوند استفاده می‌کنند. از نظر ساختاری سیدروفورهای گوناگونی براساس

^۷Atypical

^۸Shiga toxin producing *E. coli*

^۹Enteropathogenic *E. coli*

^۱ Enteroaggregative *E. coli* 0

^۱ Diffusely adherent *E. coli* 1

^۱ Adherent-invasive *E. coli* 2

^۱Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*

^۲Intestinal Pathogenic *Escherichiacoli*

^۳Diarrheagenic *E. coli*

^۴Pathotypes

^۵Enteroinvasive *E. coli*

^۶Typical

سیدروفور (*iutA* و *fyuA*)، سیترات آهن (*fecA*)، آهن (*sitA*) و هم (*chuA*) و ژن سنتز آنتروباکترین *iucD* می‌باشد (۱۷). از آنجایی که توانایی جذب آهن با بیماری زایی مرتبط است، بررسی ژنتیکی سیستم‌های جذب آهن می‌تواند برای غربالگری سویه‌های *E. coli* بیماری‌زا از اهمیت زیادی برخوردار باشد. بر اساس اکثر مطالعات موجود تنها چند ژن حدت مرتبط با جذب آهن در *E. coli* مورد بررسی قرار گرفته است (۱۸-۱۹). به دلیل پیچیدگی سیستم‌های انتقال آهن، بررسی ژن‌های بیشتر ممکن است منجر به پاتوتایپ‌سازی *E. coli* با وضوح بهتر و تعیین حدت DEC، ExpPEC و همچنین پاتوتیپ‌های هیبریدی DEC-ExpPEC در حال ظهور بر اساس ژن‌های دخیل در جذب آهن استفاده شود (۲۰). ما در این مطالعه به شناسایی و ارزیابی ژن‌های کدکننده سیستم‌های جذب آهن در جدایه‌های اشریشیاکلی چسبنده‌ی روده‌ای جدا شده از نمونه‌های اسهال پرداختیم.

روش کار

در این مطالعه توصیفی از ۴۴ جدایه‌ی EAEC گلیسروله شده با ۳۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد در فریزر آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد جهت انجام آزمایشات استفاده گردید.

استخراج DNA: DNA جدایه‌ها با استفاده از روش جوشاندن استخراج گردید. با استفاده از لوپ استریل از سطح محیط کشت تازه LB agar (۲۴ ساعته) چند پرگنه برداشته شد و به میکروتیوب ۱/۵ دارای ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه و حل گردید و به مدت ۱۵ تا ۳۰ ثانیه ورتکس شد، سپس به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و بعد از آن ۵ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد سرد گردید، میکروتیوب‌ها با ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۲ دقیقه و یا ۸۰۰۰ هزار دور در ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و به میزان ۳۰۰ میکرولیتر با استفاده از سمپلر از سطح رویی مایع برداشته شد و به عنوان DNA در میکروتیوب‌های ۰/۵ ذخیره‌سازی شد و در داخل فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت استفاده (های) بعدی قرار داده شد.

عامل درگیر در جذب آهن شناسایی شدند. دسته اول شامل سیدروفورهای فنل-کاتکول (Phenol-Catecolates) هستند. این سیدروفورها سه حلقه کاتکول در ساختار خود دارند که با آهن محیط اتصال قوی ایجاد می‌کند، باکتری‌های روده‌ای از مهمترین منابع تولید کننده سیدروفورهای فنل-کاتکول هستند. سیدروفورهای فنل-کاتکول از آن جمله می‌توان به انتروباکترین (Entrobactin)، آگروباکترین (Agrobactin)، پیوکلین (Pyochelin) و مایکوباکترین (Mycobactin) اشاره نمود. هیدروکسامات‌ها (Hydroxamates) دسته دیگری از سیدروفورها را تشکیل می‌دهند. آنتروباکترین (Aerobactin)، شیزوکینین (Schizokine) و همچنین فری اکسامین‌های حلقه‌ای از این دسته هستند. گروه بعدی سیدروفورهای نوع کربوکسیلات (Carboxilate) هستند که مشخص‌ترین نمونه آن ریزوباکترین (Rhizobactin) است. دسته چهارم سیدروفورهای باکتریایی، پیووریدین‌ها (Pyoverdine) هستند. این سیدروفورها، کروموپتیدهای محلول در آب و به رنگ سبز-زرد هستند. تاکنون جنس‌های زیادی از باکتری‌ها شناسایی شده‌اند که بخصوص در ناحیه ریزوسفری در ایفای این نقش مشارکت فعال دارند (۱۰-۱۱). بعد از تولید سیدروفورها، سیدروفورها از طریق پمپ‌های افلاکس از غشا سیتوپلاسمی خارج و به آهن متصل می‌شوند. ترکیب سیدروفور-آهن فریک بایستی مجدداً وارد باکتری گردد تا آهن را در اختیار باکتری قرار دهد ولی به علت اندازه بزرگ و همچنین غلظت پایین، عبور آنها از کانال‌های پورینی غشا خارجی امکان‌پذیر نیست لذا از رسپتورهای اختصاصی جهت ورود استفاده می‌شود (۱۲). از سال ۱۹۶۸ که بولن و همکاران، تأثیر آهن را در بیماری‌زایی *E. coli* نشان دادند، نقش سیستم‌های جذب آهن در بیماری‌زایی مورد توجه قرار گرفت (۱۳). تا به امروز، سیستم‌های مختلف اکتساب آهن در *E. coli* کشف شده است که نقش آنها به عنوان فاکتورهای حدت بیشتر در گروه ExPEC و کمتر در سویه‌های DEC مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۴-۱۶). ژنی که برای تعیین خصوصیات مولکولی *E. coli* در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفتند شامل گیرنده‌های غشای بیرونی برای سه نوع

شناسایی ژن‌های کد کننده سیستم‌های جذب آهن به روش مولکولی PCR: برای شناسایی ۷ ژن کد کننده سیستم جذب آهن (*iroN, iutA, fecA, fyuA, sitA, irp2, iucD*) در جدایه‌های

اشریشیاکلی چسبنده‌ی روده‌ای از پرایمرهای (جدول ۱) و روش Multiplex-PCR در دو پانل: پانل ۱ (*iroN, iutA, fecA*)، پانل ۲: (*iucD*) Singleplex-PCR در پانل ۳ (*fyuA, sitA, irp2*) و روش استفاده شد (۲۱).

جدول ۱. شرایط PCR و ویژگی‌های پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

شماره پانل	پرایمر	توالی پرایمر (5' به 3')	عملکرد	دما	غلظت پرایمر	اندازه پرایمر	رفرانس
۱	<i>iroN</i>	F:AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCC R:GTTTCGGGCAACCCCTGCTTTGACTT	گیرنده غشایی خارجی سالموکلین	۶۱°C 1min	۰/۳۷	۵۰۰	۲۲
	<i>iutA</i>	F:GGCTGGACATCATGGGAAGCTGG R:CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	گیرنده غشایی خارجی آنروباکتین		۰/۳۷	۲۸۲	۲۳
	<i>fecA</i>	F:CGGGTATGCGTTTCGAACAT R:CGAGCCTTCAGTGTTCAT	گیرنده غشایی خارجی سیترات آهن		۰/۳۷	۱۵۰	۲۱
۲	<i>fyuA</i>	F: TGATTAACCCCGCGACGGGAA R: CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	گیرنده غشایی خارجی یرسینیا باکتین	۶۳°C 1 min	۰/۲۲	۷۸۷	۲۳
	<i>sitA</i>	F:CGCAGGGGGCACAACCTGAT R:CCCTGTACCAGCGTACTGG	گیرنده غشایی خارجی آهن		۰/۳۷	۶۶۳	۲۴
	<i>irp2</i>	F:AAGGATTCGCTGTTACCGGAC R:AACTCCTGATACAGGTGGC	شرکت در سنتز سیدروفور یرسینیا باکتین		۰/۳۷	۴۱۳	۲۵
۳	<i>iucD</i>	F:ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC R:CCTGATCCAGCTGATGCTC	شرکت در سنتز سیدروفور آنروباکتین	۵۹°C 1 min	۰/۳۷	۷۱۴	۲۵

واسرشت ۹۴^۲ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال ۶۱^۳ درجه سانتی گراد برای ۶۰ ثانیه و در نهایت گسترش ۷۲^۴ درجه سانتی گراد برای ۴۵ ثانیه، پس از اتمام سیکل‌ها گسترش نهایی ۷۲^۵ درجه سانتی گراد برای ۷ دقیقه به عنوان مرحله‌ی گسترش نهایی در نظر گرفته شد.

PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت. در پانل ۱ حجم واکنش Multiplex-PCR، ۲۰ میکرولیتر بود و غلظت و حجم اجزای آن شامل ۰/۳۷ میکرومولار پرایمر، ۲ میکرولیتر DNA، ۱۰ میکرولیتر Master mix PCR (سیناکلون ایران) و آب مقطر تا حجم واکنش بود. برنامه‌ی دمایی سیکل PCR عبارت بود از: واسرشت اولیه ۹۴^۱ درجه سانتی گراد برای ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل دمایی شامل

⁴Extension

⁵Final extension

¹Initial denaturation

²Denaturation

³Annealing

DNA، ۱۰ میکرولیتر PCR2 Master mix (سیناکلون ایران) و آب مقطر تا حجم واکنش بود. برنامه‌ی دمایی سیکل PCR عبارت بود از: واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل دمایی شامل واسرشت ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال ۵۹ درجه سانتی گراد برای ۶۰ ثانیه و در نهایت گسترش ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۴۵ ثانیه، پس از اتمام سیکل‌ها گسترش نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۷ دقیقه به عنوان مرحله‌ی گسترش نهایی در نظر گرفته شد (جدول ۲). در نهایت آشکار سازی محصول PCR با الکتروفورز صورت گرفت. ۱۲ میکرولیتر از آن بر روی ژل آگاروز ۱٪/۵ و رنگ آمیزی با گرین ویور (ساخت ایران) انجام شد و قطعات تکثیر شده با استفاده از مارکر ۱۰۰ Ladder ارزیابی گردید (شکل ۱).

در پانل ۲ حجم واکنش Multiplex-PCR، ۲۰ میکرولیتر بود و غلظت و حجم اجزای آن شامل ۰/۳۷ میکرومولار پرایمر برای پرایمرهای *sitA*، *irp2* و برای پرایمر *fyuA* حجم ۰/۲۲ میکرومولار، ۲ میکرولیتر DNA، ۱۰ میکرولیتر Master mix PCR2 (سیناکلون ایران) و آب مقطر تا حجم واکنش بود. برنامه‌ی دمایی سیکل PCR عبارت بود از: واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل دمایی شامل واسرشت ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال ۶۳ درجه سانتی گراد برای ۶۰ ثانیه و در نهایت گسترش ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۴۵ ثانیه، پس از اتمام سیکل‌ها گسترش نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۷ دقیقه به عنوان مرحله‌ی گسترش نهایی در نظر گرفته شد.

در پانل ۳ حجم واکنش Singleplex-PCR، ۲۰ میکرولیتر بود و غلظت و حجم اجزای آن شامل ۰/۳۷ میکرومولار، ۲ میکرولیتر

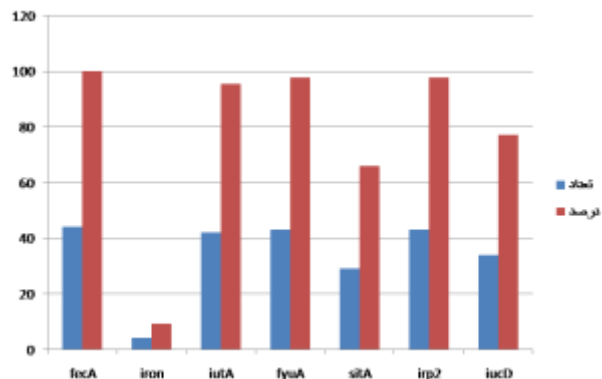


شکل ۱. تصویر ژل الکتروفورز: به ترتیب از سمت چپ M مربوط به چاهک مارکر (لدر)، چاهک ۱ تا ۸ مربوط به پانل ۱ (*iron*، *iutA*، *fecA*)، چاهک ۱ تا ۶ مربوط به پانل ۲ (*fyuA*، *sitA*، *irp2*) و چاهک ۱ مربوط به پانل ۳ (*iucD*) می‌باشد.

نتایج

می‌دهد. جدول ۲ توزیع فراوانی ژن‌های کسب آهن در ۴۴ جدایه EAEC را بیان می‌کند. و ۷ پروفایل ژن‌های کد کننده سیستم‌های مختلف جذب آهن شناسایی گردید. که بیشترین فراوانی مربوط به پروفایل ژنی *fecA*، *iutA*، *fyuA*، *sitA*، *irp2*، *iucD* می‌باشد (جدول ۳).

نتایج نشان داد که در ۴۴ جدایه EAEC به ترتیب توزیع فراوانی مربوط به ژن‌های جذب آهن *fecA* (۱۰۰٪/۴۴)، *fyuA* (۹۷٪/۴۳)، *irp2* (۹۷٪/۴۳)، *iutA* (۹۵٪/۴۲)، *iucD* (۷۷٪/۳۴)، *sitA* (۶۵٪/۲۹) و *iron* (۹٪/۴) بود. نمودار ۱ درصد ژن‌های کسب آهن در ۴۴ جدایه اشریشیاکلی چسبنده‌ی روده‌ای، را نشان



نمودار ۱- درصد ژن‌های کسب آهن در ۴۴ جدایه اشریشیا کلی چسبنده‌ی روده‌ای

جدول ۲- توزیع فراوانی ژن‌های کسب آهن در جدایه‌های EAEC

ژن حدت	EAEC		جمع (تعداد=۴۴)
	تیبیکال - EAEC	آتیبیکال - EAEC	
	(تعداد=۳۸)	(تعداد=۶)	
	تعداد	تعداد	تعداد
<i>fecA</i>	۳۸	۶	۴۴
<i>Iron</i>	۴	۰	۴
<i>iutA</i>	۳۷	۵	۴۲
<i>fyuA</i>	۳۸	۵	۴۳
<i>sitA</i>	۲۷	۲	۲۹
<i>irp2</i>	۳۸	۵	۴۳
<i>iucD</i>	۲۹	۵	۳۴

جدول ۳- پروفایل ژن‌های کسب آهن در جدایه‌های EAEC

شماره	پروفایل ژن‌های کسب آهن در EAEC	جدایه‌های EAEC
۱	<i>FecA</i>	۱
۲	<i>fecA, fyuA, irp2</i>	۱
۳	<i>fecA, iutA, fyuA, irp2</i>	۷
۴	<i>fecA, iutA, fyuA, sitA, irp2</i>	۱
۵	<i>fecA, iutA, fyuA, irp2, iucD</i>	۶
۶	<i>fecA, iutA, fyuA, sitA, irp2, iucD</i>	۲۴
۷	<i>fecA, iron, iutA, fyuA, sitA, irp2, iucD</i>	۴

بحث

در مطالعه حاضر ۷ ژن حدت (*sita fyuA fecA iutA iroN*) مربوط به سیستم‌های مختلف جذب آهن در ۴۴ جدایه EAEC غربالگری شدند و نتایج نشان دادند که در ۴۴ جدایه EAEC به ترتیب توزیع فراوانی مربوط به ژن‌های جذب آهن *fecA* (۱۰۰٪)، *fyuA* (۹۷/۷۳)٪، *irp2* (۹۷/۷۳)٪، *fecA* (۴۳٪)، *iutA* (۹۵/۴۵)٪، *iucD* (۷۷/۲۷)٪، *sita* (۶۵/۹۱)٪، *iron* (۹/۰۹)٪، *iroN* (۴)٪ بود و ۷ پروفایل ژن‌های کد کننده سیستم‌های مختلف جذب آهن شناسایی گردید. که بیشترین فراوانی مربوط به پروفایل ژنی *fecA*، *fecA*، *iucD*، *irp2*، *sita*، *fyuA*، *iutA* می‌باشد. در تمامی جدایه‌های *fecA* وجود داشت و درصد بالایی از سایر ژن‌های جذب آهن وجود دارد که این نشان می‌دهد جدایه‌های EAEC برای جذب آهن در شرایط کمبود آهن ترکیبات کلاته کننده آهن نظیر سیدروفورها توسط باکتری ایجاد می‌شود. در این مطالعه نشان داده شده که جدایه‌های EAEC علاوه بر سیدروفورهای فنل-کاتکول (Phenol-Catecolates) از هیدروکسامات‌ها (Hydroxamates) دسته دیگری از سیدروفورها برای جذب آهن استفاده می‌کنند. در مطالعه‌ی هاشمی تبار و همکاران در سال ۲۰۱۹ که به منظور سنجش پروفایل

حدت سیستم‌های مختلف جذب آهن در اشریشیاکلی به روش Multiplex-PCR صورت گرفت. سه پانل طراحی شد و ۹ ژن حدت (*iroN*، *iutA*، *fecA*، *fyuA*، *sita*، *irp2*، *iucD*، *chuA*، *tonB*) سیستم جذب آهن بر روی ۳۹ پاتوتیپ‌های مختلف اشریشیاکلی (APEC، UPEC، MPEC، DEC) مورد سنجش قرار دادند. در مجموع، سه ژن *tonB* (۱۰۰٪)، *fecA* (۶۶/۶)٪ و *sita* (۵۸/۹)٪ بیشترین فراوانی را داشتند (۲۱). که با مطالعه حاضر مطابقت دارد. و تاکنون مطالعه‌ی در مورد شناسایی و جداسازی ژن‌های جذب آهن بر روی جدایه‌های EAEC جدا شده از موارد اسهالی انجام نشده است.

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که جدایه‌های EAEC در شرایط پایین بودن آهن آزاد توانایی تولید سیدروفورها را دارند و انواع سیدروفورها مانند سیدروفورهای فنل-کاتکول و هیدروکسامات‌ها را سنتز می‌کنند و جهت دریافت آهن مورد نیازشان از تنوع پروفایل سیستم‌های مختلف جذب آهن استفاده می‌کنند.

تشکر و قدردانی: بدینوسیله از عزیزانی که در انجام آزمایشات همکاری کردند، کمال تشکر را دارم.

References

1. Nataro P, Kaper B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. ASM Journals. Clinical Microbiology Reviews. 1998;11(1).
2. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clinical microbiology reviews. 2013; 26(4): 822-80.
3. Gomes T, Elias W, Scaletsky I, Guth B, Rodrigues J, Piazza R, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Brazilian journal of microbiology. 2016. 47.
4. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature reviews microbiology. 2004; 2(2): 123-40.
5. Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. *E. coli* as an all rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. Between pathogenicity and commensalism. 2013: 3-32.
6. Nataro P, Steiner T, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli*. Emerging Infectious Diseases. 1998; 4(2).
7. Brock JH. The physiology of lactoferrin. Biochem Cell Biol. 2002; 80: 1-6.
8. Kawabata H, Sakamoto S, Masuda T, Uchiyama T, Ohmori K, Koeffler H P et al. Roles of transferrin receptors in erythropoiesis. Rinsho ketsueki. 2016; 57: 951 8.
9. GrayOwen SD, Schyvers AB. Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. Trends Microbiol. 1996; 4: 185-91.
10. Saha R, Saha N, Donofrio RS, Bestervelt LL. Microbial siderophores: a mini review. Journal Basic Microbiol. 2013; 53: 303-17.
11. Neilands JB. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. Journal Biology Chem. 1995; 270: 26723-6.
12. Skaar EP. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. PLoS pathog 2010; 6: 1000949.
13. Bullen JJ, Leigh LC, Rogers HJ. The effect of iron compounds on the virulence of *Escherichia coli* for guinea pigs. Immunology. 1968; 15: 581-88.
14. Braun V. Iron uptake by *Escherichia coli*. Front Biosci 2003; 8: 1409-21.
15. Gao Q, Wang X, Xu H, Xu Y, Ling J, Zhang D, et al. Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: salmochelin and aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection model. BMC Microbiol. 2012; 12: 143.
16. Hajihosein-Tabrizi A, Habibi M, Tabasi M, AsadiKaram MR. Distribution of genes encoding iron uptake systems among the *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients of Iran. Journal Medical Microbiol Infection Diseases. 2018; 6: 25-30.
17. Caza M, Kronstad JW. Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. Front Cell Infect Microbiol. 2013; 3: 80.
18. Rijavec M, MullerPremru M, Zakotnik B, Žgur-Bertok D. Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. Journal Medical Microbiol. 2008; 57: 1329-34.
19. Derakhshandeh A, Firouzi R, Motamedifar M, Arabshahi S, Novinrooz A, Boroojeni AM, et al. Virulence characteristics and antibiotic resistance patterns among various phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates. Jpn Journal Infection Diseases. 2015; 68: 428-31.
20. Lindstedt B-A, Finton MD, Porcellato D, Brandal LT. High frequency of hybrid *Escherichia coli* strains with combined Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* (IPEC) and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) virulence factors isolated from human faecal samples. BMC Infect Diseases. 2018; 18: 544.
21. Hashemi Tabar G, Askari Badouei M, Kalateh Rahmani H, Khoramian B. Development of three multiplex-PCR assays for virulence profiling of different iron acquisition systems in *Escherichia coli*. Iran Microbiology Journal. 2020; 12(4): 281-8.
22. Johnson TJ, Wannemuehler Y, Doetkott C, Johnson SJ, Rosenberger SC, Nolan LK. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. Journal Clinic Microbiol. 2008; 46: 3987-96.
23. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. Journal Infection Diseases. 2000; 181: 261-272.
24. Sabri M, Caza M, Proulx J, Lymberopoulos MH, Bree A, Moulin-Schouleur M, et al. Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122. Infection Immunology. 2008; 76: 601-611.
25. Ewers C, Janßen T, Kießling S, Philipp HC, Wieler LH. Rapid detection of virulence associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. Avian Diseases. 2005; 49: 269-73.

Original Article

Evaluation of genes encoding iron absorption systems in Enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) isolates isolated from diarrhea specimens

Received: 29/01/2023 - Accepted: 10/06/2023

Zakia Imanpanah^{1*}
Gholamreza Hashemi Tabar¹
Mehdi Askari Bedoui¹
Kiarash Ghazvini²

¹Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
²Department of Microbiology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Email: golkar34@gmail.com

Abstract

Introduction

Most Escherichia coli are not pathogenic. But some strains of E. Coli become pathogenic by acquiring and synthesizing diverse virulence genes. Iron, as an essential nutrient, has a proven role in the pathogenicity of E. coli. One of the most common strategies of microorganisms in the presence of free iron is the production of siderophores. Siderophores act as extracellular agents for the absorption of iron from minerals or organic compounds in the absence of iron. The Purpose of this study was to identify and evaluate the genes encoding iron absorption systems in Enteroaggregative Escherichia coli isolates isolated from diarrhea specimens.

Material and Method

In this study, three panels were designed. Panel 1: *iroN*, *iutA*, *fecA*, Panel 2: *fyuA*, *sitA*, *irp2* and Panel 3: *iucD*. In panels 1 and 2, Triplex-PCR method and panel 3, single-PCR method were used and 44 EAEC isolates isolated from diarrhea samples were screened by these three panels.

Results

The results showed that a total of 44 EAEC isolates had respectively the highest frequency of *fecA* 44(100%), *fyuA* 43(97.73%), *irp2* 43(97.73%), *iutA* 42(95.45%), *iucD* 34(77.27%), *sitA* 29(65.91%) and *iroN* 4(9.09%). and 7 gene profiles encoding different iron absorption systems were identified.

Conclusion

The results showed that EAEC isolates have the ability to produce synthesize a variety of siderophores and use the variety of profiles of different iron absorption systems to obtain the required iron.

Key words

EAEC, siderophore, iron absorption, diarrhea, Triplex-PCR

Acknowledgement: There is no conflict of interest