

Evaluation of *eaeA* gene expression in Enteropathogenic *Escherichia coli* in the presence of fructose

Nasrin Shakarami¹, Mohammad Reza Mehrabi^{*2}, Mohsen Mirzaee², Reza Yari³

1. Department of Biology, Bo. C., Islamic Azad University, Borujerd, Iran.

2. Department of Laboratory Science, Bo. C., Islamic Azad University, Borujerd, Iran.

3. Department of Biology, Medicinal Plants, Health and Food Safety Research Center, Bo. C., Islamic Azad University, Borujerd, Iran.

Abstract

Aim and Background Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is one of the oldest identified pathotypes of *Escherichia coli* that proliferates in the small intestine and causes acute and non-bloody diarrhea in developing countries. One of the main causes of pathogenicity of this bacterium is *eaeA* gene activity. This study aimed to investigate the expression of the *eaeA* gene in this bacterium in the presence of fructose as a potential inhibitory factor derived from honey's sugar components.

Materials and Methods: In this descriptive cross-sectional study, four isolates of EPEC were first cultured, and the presence of the *eaeA* gene was confirmed by PCR. Then, RNA extraction was performed on culture media supplemented with fructose concentrations of 2%, 8.5%, 17%, and 34% (Merck, Germany), with a fructose-free sample as a control. Finally, the Real-time PCR technique (ABI StepOne, USA) was used to investigate the effect of fructose on *eaeA* gene expression.

Results: The results showed that the studied fructose had a significant effect on the expression of the *eaeA* gene in EPEC ($p < 0.05$). While the expression of the *eaeA* gene at 2% fructose concentration was higher than other treatments, it showed a significant decrease compared to the control group. Gene expression decreased further at 8.5% and 17% concentrations and was completely inhibited at 34% concentration.

Conclusion: Since *eaeA* gene expression is one of the most important virulence factors for EPEC colonization, the results suggest that fructose can effectively reduce EPEC pathogenicity in a dose-dependent manner. According to the results, controlled oral consumption of fructose or fructose-containing products may partially inhibit EPEC activity in patients; however, this requires further clinical trials.

Keywords: *Escherichia coli*, EPEC, *eaeA* gene, Fructose.

Corresponding Author:

Mohammad Reza Mehrabi, Department of Laboratory Science, Bo. C., Islamic Azad University, Borujerd, Iran

E-mail: mr.mehrabi@iau.ac.ir

بررسی بیان ژن *eaeA* در باکتری *اشریشیا کلی* انتروپاتوژنیک در حضور فروکتوز

نسرین شاکرمی^۱، محمدرضا مهربانی^{۲*}، محسن میرزایی^۲، رضا یاری^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران.
۲. استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران.
۳. استادیار، گروه زیست شناسی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، سلامت و امنیت غذایی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: *اشریشیا کلی* انتروپاتوژنیک (EPEC) یکی از قدیمی ترین پاتوتایپ های شناسایی شده *اشریشیا کلی* است که در روده کوچک تکثیر می یابد و عامل اسهال حاد و غیرخونی در کشورهای در حال توسعه محسوب می شود. یکی از عوامل اصلی بیماری زایی این باکتری، فعالیت ژن *eaeA* می باشد. این مطالعه با هدف بررسی بیان ژن *eaeA* این باکتری در حضور فروکتوز، به عنوان یک عامل مهارکننده احتمالی بر پایه ترکیب های قندی عسل انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه، ابتدا ۴ جدایه باکتریایی EPEC کشت داده شدند و پس از استخراج DNA، وجود ژن *eaeA* با استفاده از PCR تأیید شد. سپس استخراج RNA از روی محیط های کشت همراه با غلظت های فروکتوز ۲، ۵/۸، ۱۷ و ۳۴ درصد (Merck, Germany) و نمونه کنترل فاقد فروکتوز انجام شد. در نهایت جهت بررسی تأثیر فروکتوز بر بیان ژن *eaeA* از تکنیک Real-Time PCR (ABI step one, USA) استفاده شد.

یافته ها: نتایج نشان دادند که فروکتوز مورد مطالعه تأثیر معنی داری بر بیان ژن *eaeA* در EPEC در غلظت های مختلف دارد. میزان بیان ژن *eaeA* در فروکتوز در غلظت ۲ درصد اگرچه نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود، اما نسبت به گروه کنترل کاهش بیان نشان داد ($p < 0/05$). در غلظت ۵/۸ و ۱۷ درصد به ترتیب کاهش بیان ژن شدیدتر و در غلظت ۳۴ درصد بیان ژن به طور کامل مهار شد.

نتیجه گیری: از آنجایی که بیان ژن *eaeA* از مهم ترین فاکتورهای ویروالانس و کلونیزاسیون باکتری EPEC می باشد، با توجه به نتایج این پژوهش می توان گفت شاید فروکتوز بتواند بر کاهش بیماری زایی EPEC و بهبود اسهال در کودکان و بزرگسالان مؤثر باشد. همچنین با توجه به نتایج مطالعه حاضر می توان بیان داشت که مصرف فروکتوز می تواند بر کاهش بیماری زایی نیز مؤثر باشد. به علاوه نتایج نشان دادند که مصرف مستقیم و وابسته به دوز (Dose-dependent) فروکتوز یا داروهای حاوی آن احتمالاً قادر به مهار فعالیت این ژن در بیماران می باشد اما تأیید نهایی نیاز به کارآزمایی های بالینی دارد.

واژگان کلیدی: *اشریشیا کلی*، EPEC، ژن *eaeA*، فروکتوز.

*نویسنده مسئول: محمدرضا مهربانی، استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی،

واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران.

پست الکترونیکی: mr.mehrabi@iau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۰۶

۱- مقدمه

/شریشیا کلی انتروپاتوژن^۱، باکتری گرم منفی است که به صورت تک گیر و همه گیر، علت عمده اسهال حاد و غیرخونی در کودکان کشورهای در حال توسعه می باشد (۲ و ۱). ویژگی این پاتوتایپ ایجاد ضایعات هیستوپاتولوژیک در اپی تلیوم روده بوده ولی قادر به تولید سموم شیگا نمی باشد. سویه های معمول این پاتوتایپ، پلاسمیدهایی را با خود حمل می کنند که آن ها را قادر می سازد تا فیلامنت هایی به نام BFP^۲ تولید کرده تا به صورت موضعی به سلول های اپی تلیال متصل شوند (۳). این باکتری از طریق اتصال به سلول های اپی تلیال روده سبب اختلال در ساختار این سلول ها شده و سبب ایجاد ضایعات هیستوپاتولوژیک A/E^۳ در سطح روده می شود. این امر منجر به اختلال در عملکرد جذب و دفع روده ای می شود (۴). قابلیت ایجاد ضایعات A/E توسط ژن هایی گد می شود که این ژن ها در جزیره بیماری زایی^۴ باکتری قرار دارند. پاتوتایپ انتروپاتوژنیک در لوکوس ژنی LEE^۵ دارای ژن *eaeA*^۶ می باشد که پروتئین اینتیمین با وزن مولکولی ۹۴ کیلودالتون تولید می کند. این پروتئین، قابلیت اتصال به انتروسیت ها و ایجاد ضایعات A/E را دارد (۵ و ۴). فروکتوز با فرمول ساختاری C₆H₁₂O₆ قندی است که از طریق مصرف عسل، میوه و افزودن شکر و شیرین کننده ها به رژیم غذایی دریافت می گردد (۶). خاصیت ضدباکتریایی و همچنین پاک سازی و ترمیم زخم توسط عسل از دوران باستان شناخته شده بود. خاصیت شفا بخش عسل به فعالیت ضدباکتریایی، حفظ شرایط مرطوب زخم و ویسکوزیته بالای آن بازمی گردد و به ایجاد یک سد محافظ در برابر عفونت کمک می کند. خواص ایمنی شناسی عسل مربوط به خواص تعدیل کنندگی ایمنی جهت ترمیم سریع تر زخم ها می باشد (۶). عسل طبیعی حرارت ندیده در برابر باکتری های پاتوژن (از جمله /شریشیا کلی)، باکتری های دهان و همچنین باکتری های فاسد کننده مواد غذایی طیف گسترده ای از فعالیت ضد میکروبی از خود نشان می دهد (۶). عسل ترکیب جاذب رطوبت است به

این معنا که می تواند رطوبت را خارج سازد و در نتیجه قادر است باکتری ها را با دهیدراتاسیون منهدم کند. عسل با محتوای بالای فروکتوز و pH پایین خود می تواند از رشد میکروارگانیسم ها جلوگیری کند. همچنین می تواند باعث تسریع در ترمیم مخاط روده آسیب دیده و تحریک رشد بافت جدید شود و همچنین به عنوان یک عامل ضد التهاب عمل کند (۷).

هدف پژوهش حاضر بررسی امکان کاهش بیان ژن *eaeA* در حضور فروکتوز است تا مشخص شود آیا مصرف مواد غذایی حاوی فروکتوز مانند عسل می توانند تأثیری در مهار اسهال و کنترل بیماری زایی EPEC داشته باشد یا خیر. باکتری های نادری وجود دارند که قادر به استفاده از فروکتوز و رفع اثر مهاری آن در مواد غذایی و دارویی می باشند و شاید یکی از علل التیام بخشی و استفاده از عسل برای پانسمان زخم ها و ترمیم مخاط روده آسیب دیده وجود همین فروکتوز باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- جداسازی، شناسایی و کشت باکتری ها

مطالعه حاضر با کد اخلاق IR.IAU.B.REC.1402.029 به ثبت رسیده و طی دوره ۶ ماهه در سال ۱۴۰۲ انجام شده است. در این مطالعه توصیفی-مقطعی، جدایه های باکتری از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان شهرستان بروجرد جمع آوری شده و به آزمایشگاه تحقیقات میکروبی دانشگاه آزاد بروجرد منتقل و در محیط BHI گلیسرول دار نگهداری شدند. در ادامه مطالعه جدایه ها یخ زدایی شده و مجدداً بر روی محیط BHI احیا شدند. سپس جدایه ها روی محیط بلادآگار و EMB کشت داده شده و کلنی های جدا شده از نظر جنس و گونه از طریق آزمون های بیوشیمیایی IMVIC و مولکولی با پرایمر 16s rRNA و در نهایت سروتایپینگ؛ EPEC بودن آن ها تأیید شد (روش ترکیبی بیوشیمیایی و مولکولی). در نهایت ۴ جدایه از باکتری /شریشیا کلی انتروپاتوژنیک شناسایی و مورد بررسی قرار گرفتند. در تمامی مراحل آزمایش از سویه استاندارد

⁴ Pathogenicity Island

⁵ Locus of Enterocyte Effacement

⁶ *Escherichia coli* attaching and effacing

¹ EnteroPathogenic *Escherichia coli*; EPEC

² Bundle Forming Pili

³ Attaching and Effacing Lesion

ATCC 43887 (*eaeA* مثبت و *stx* منفی) جهت کنترل کیفی استفاده شد.

۲-۲- استخراج DNA

ابتدا جدایه‌ها روی محیط BHI برات به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شده و سپس از باکتری‌های رشدیافته، DNA ژنومیک به روش جوشاندن استخراج گردید. بدین صورت که پس از سانتریفیوژ مختصر، مایع رویی دور ریخته و چند کلنی از باکتری را در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری به صورت سوسپانسیون درآورده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس قرار داده شد تا سلول‌ها

لیز شوند و پس از خنک شدن به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید. مایع رویی حاوی DNA به درون میکروتیوب استریل منتقل شد و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس به منظور انجام واکنش PCR ذخیره شد (۸).

۲-۳- آماده سازی پرایمر و انجام PCR

پرایمرهای مورد استفاده (جدول ۱) از شرکت سیناژن خریداری شد و بعد از رقیق سازی با غلظت ۱۰ پیکومولار برای تهیه مخلوط PCR استفاده گردید.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های *eaeA* و *16s rRNA* (۹)

ژن	توالی نوکلئوتیدی ۵' → ۳'	طول قطعات bp
<i>eaeA</i>	F: CGGCGATTACGCGAAAGA R: CCTAAATTTGCCGTAAAGCGG	۲۳۱
<i>16s rRNA</i>	F: AGTTATCCCCCTCCATCAGG R: TGCAAGTCGAACGGTAACAG	۹۹

می‌باشد. جهت تکثیر ژن مورد مطالعه از ترموسایکلر BioRad C1001 استفاده گردید. برنامه دمایی برای واسرشت اولیه ژن *eaeA* و *16s rRNA* و طول شدن نهایی به ترتیب ۹۴ و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه لحاظ شد (جدول ۲).

حجم نهایی واکنش PCR جهت شناسایی ژن *16s rRNA* و *eaeA*، ۲۵ میکرولیتر بود که شامل ۳ میکرولیتر DNA الگو (۱ نانوگرم بر میکرولیتر)، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس ۲x (Ampliqon دانمارک)، یک میکرولیتر از هر پرایمر (با غلظت ۱۰ پیکومولار) و ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل

جدول ۲- برنامه دمایی/زمانی PCR

مراحل	چرخه	زمان	دما (درجه سلسیوس)	ژن
دناوراسیون اولیه	۱	۱ دقیقه	۹۵ درجه	<i>16s rRNA</i>
باز شدن DNA	۳۴	۲۰ ثانیه	۹۴ درجه	
اتصال پرایمر		۲۵ ثانیه	۶۰ درجه	
گسترش DNA		۲۰ ثانیه	۷۲ درجه	
طول شدن نهایی	۱	۱ دقیقه	۷۲ درجه	<i>eaeA</i>
دناوراسیون اولیه	۱	۵ دقیقه	۹۴ درجه	
باز شدن DNA	۳۴	۳۰ ثانیه	۹۴ درجه	
اتصال پرایمر		۲۵ ثانیه	۵۸ درجه	
گسترش DNA		۳۰ ثانیه	۷۲ درجه	
طول شدن نهایی	۱	۵ دقیقه	۷۲ درجه	<i>eaeA</i>
(HOLD)	-	-	۴ درجه	

سه میکرولیتر از محصول نهایی PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد با بفر TBE الکتروفورز شد. از DNA مارکر ۱۰۰bp شرکت سیناژن برای شناسایی باند مورد نظر استفاده شد.

۲-۴- الکتروفورز محصول PCR

شکل ۱- منحنی ذوب و تکثیر ژن *eaeA*.

۲-۵- استخراج RNA و سنتز cDNA

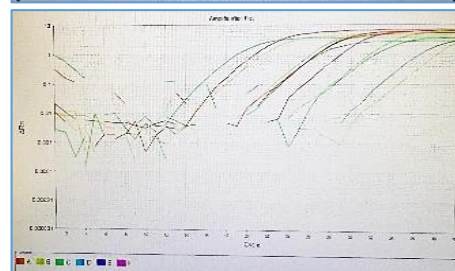
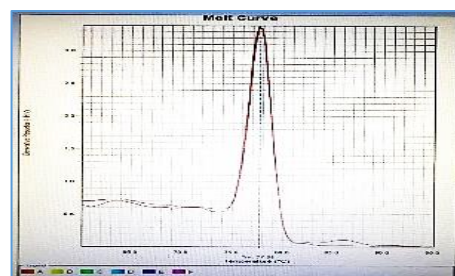
کشت جدایه ها بدون حضور فروکتوز و کشت در حضور غلظت های مختلف ۲، ۸/۵، ۱۷ و ۳۴ درصد فروکتوز انجام شد. به دلیل عدم انجام مطالعه ای درخصوص غلظت تیمارهای فروکتوز، این مقادیر در مطالعه حاضر براساس غلظت های فروکتوز برحسب میزان قند موجود در عسل یا آستانه تحمل اسمزی باکتری انتخاب شده اند. جهت استخراج RNA و سنتز cDNA طبق دستورالعمل کیت شرکت سیناکلون اقدام شد (Kit Cat No. EX6051).

۲-۶- بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده

پس از استخراج RNA، کمیّت و کیفیت آن با روش های UV اسپکتروفتومتری با استفاده از جذب نوری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد جهت ارزیابی حضور باندهای RNA ریبوزومی ۱۶S و ۲۳S بررسی گردید (تصاویر ارائه نشده است).

۲-۷- Real-Time PCR

برای انجام واکنش از دستگاه ABI Step one آمریکا استفاده شد. واکنش در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۷/۵ میکرولیتر مسترمیکس ریل ROX شرکت سیناژن، ۱/۵ میکرولیتر آب مقطر فاقد RNase شرکت سیناژن، ۱ میکرولیتر cDNA و هرکدام از پرایمرهای رفت و برگشت به میزان ۰/۷ میکرولیتر انجام شد. در شکل ۱ نمودار تکثیر و منحنی ذوب ارائه شده است. دمای ذوب تمامی نمونه ها ۸۲-۸۳ درجه سلسیوس ثبت شد که منحنی تکثیر نیز صحت روش Real-Time PCR را تأیید نمود (شکل ۱).

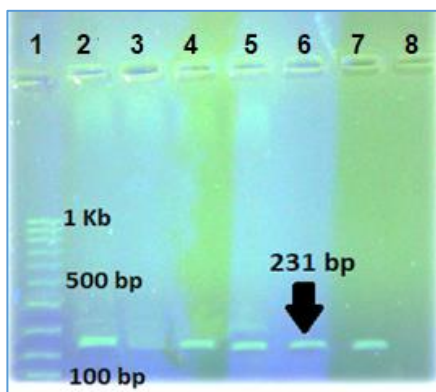


۲-۸- تجزیه و تحلیل داده ها

نتایج به دست آمده از انجام واکنش Real-Time PCR توسط نرم افزارهای SPSS ver. 26 و REST 2009 با سطح معنی داری $p < 0.05$ بررسی و آنالیز شد. تغییرهای بیان نسبی با فرمول $2^{-\Delta\Delta C_t}$ با روش Livak انجام شد. کارایی PCR بیش از ۸۵ درصد محاسبه گردید. از آزمون ANOVA جهت بررسی نتایج درون گروهی و مقایسه با کنترل (فاقد فروکتوز) و سپس توکی استفاده شد.

۳- نتایج

۳-۱- نتایج PCR جدایه های /شیرشیکلی انتروپاتوزنیک محصولات PCR ژن *eaeA* در ژل ۱/۵ درصد آگارز الکتروفورز شد. تصویر محصولات PCR به اندازه ۲۳۱ bp حاکی از وجود ژن *eaeA* در جدایه های /شیرشیکلی انتروپاتوزنیک مورد مطالعه می باشد (شکل ۲).

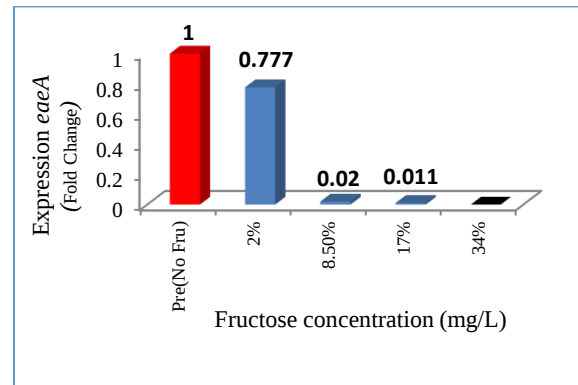


شکل ۲- ژل الکتروفورز محصول PCR ژن *eaeA* جدایه های EPEC روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. چاهک ۱: DNA Ladder 100 bp. چاهک ۲: کنترل مثبت (ATCC 43887)، چاهک ۳: کنترل منفی (سویه / شیرشیکلی فاقد ژن *eaeA*)، چاهک ۴ الی ۷: جدایه های واجد ژن *eaeA*، چاهک ۸ کنترل منفی (نمونه دارای آب مقطر به جای DNA: NTC).

۳-۲- بررسی بیان ژن *eaeA* با روش Real-Time PCR

میزان بیان ژن *eaeA* در باکتری /شیرشیکلی انتروپاتوزنیک در حضور غلظت های مختلف فروکتوز با سطح معنی داری $p < 0.05$ به این صورت بود: بیان ژن *eaeA* در حضور غلظت ۲ درصد فروکتوز بیشترین بیان در حضور غلظت های فروکتوز مورد بررسی را به مقدار ۰/۷۷ داشت و در غلظت های ۸/۵ و ۱۷ درصد فروکتوز کاهش بیان نسبت به نمونه کنترل در

سطوح ۰/۰۲ و ۰/۱۱ مشاهده شد. در غلظت ۳۴ درصد فروکتوز، مهار کامل بیان ژن بیماری زای *eaeA* نسبت به نمونه کنترل فاقد فروکتوز رخ داد (نمودار ۱).



نمودار ۱- تغییرهای میزان بیان ژن *eaeA* در جدایه های EPEC حضور غلظت های مختلف فروکتوز. سطح معنی داری $p < 0.05$.

۴- بحث

مطالعه های انجام شده توسط Kim و همکاران در سال ۲۰۲۴ و Shokouhi Moghadam و همکاران در سال ۲۰۲۲ بر لزوم استفاده از روش های استاندارد و سویه های کنترلی تأیید شده جهت ارزیابی دقیق بیان ژن های بیماری زا در پاسخ به منابع کربوهیدراتی مختلف تأکید دارند که با متدولوژی به کار رفته در پژوهش حاضر همسو می باشد (۹ و ۱۰). یافته ها نشان دادند که فروکتوز، به ویژه در غلظت های بالاتر، توانایی قابل توجهی در کاهش بیان ژن *eaeA* در جدایه های /شیرشیا کلی اینتروپاتوژنیک دارد. این نتیجه با فرضیه پژوهش مبنی بر بررسی امکان مهار اسهال و کنترل بیماری زایی EPEC از طریق مصرف مواد غذایی حاوی فروکتوز (مانند عسل) همسو است. کاهش بیان ژن *eaeA* که مسئول تولید پروتئین اینتیمین و ایجاد ضایعات A/E است؛ به طور مستقیم بر قابلیت اتصال باکتری به اینتروسیت های روده و در نتیجه بر پاتوژن EPEC تأثیر می گذارد. در غلظت ۳۴ درصد فروکتوز، مهار کامل بیان این ژن بیماری زا نشان دهنده پتانسیل بالای فروکتوز به عنوان عامل تعدیل کننده بیماری زایی EPEC است.

در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۲ در ایران توسط Najibi و همکاران انجام شد از ۳۰۹ نمونه اسهالی مربوط به کودکان زیر ۵ سال در ۲۸ جدایه (۹ درصد) EPEC گزارش شده است (۱۱). اما در مطالعه حاضر طی دوره ۶ ماهه در سال ۱۴۰۲ جداسازی ۴ جدایه EPEC از بیش از ۲۰۰ نمونه

مدفوع اطفال دچار اسهال زیر دو سال انجام شد که معادل حدود ۲ درصد فراوانی پاتوتایپ EPEC در ایجاد گاستروانتریت کودکان زیر دو سال در شهرستان بروجرد بود. همچنین در مطالعه های Moshtagian و همکاران در ۲۰۱۶ در بابل بر روی بیش از ۲۰۰ نمونه مدفوع اطفال زیر ۵ سال دچار گاستروانتریت شیوع EPEC ۲۱/۵ درصد؛ در مطالعه Ahmadi و همکاران در سال ۲۰۱۵ به صورت متاآنالیز میزان فراوانی پاتوتایپ EPEC کلاسیک و غیر کلاسیک ۱۴ درصد؛ در مطالعه Ahmadi و همکاران در سال ۲۰۱۶ این فراوانی ۱۳/۱ درصد و در آخرین مطالعه در دسترس مربوط به Eybpoosh و همکاران در سال ۲۰۲۱ این فراوانی ۱۳/۲ درصد محاسبه گردید (۱۳-۱۶). این مطالعه ها نشان دادند که EPEC با فراوانی ۱۳/۲ درصد، پاتوتایپ غالب در کودکان ایرانی مبتلا به اسهال حاد است. تفسیر یافته های این پژوهش در کنار سایر مطالعه های اپیدمیولوژیک نشان می دهند که شیوع بالای این باکتری در کودکان (به ویژه گروه سنی زیر ۵ سال) می تواند با عواملی نظیر سطح بهداشت محیط، سلامت آب و دفع فاضلاب در مناطق مختلف مرتبط باشد که این امر ضرورت مداخله های پیشگیرانه را دوچندان می کند (۱۶). در همین راستا، Moradi و همکاران در سال ۲۰۲۳ در مطالعه ای به فراوانی قابل توجه فاکتورهای ویروالانس در سویه های /شیرشیا کلی جدا شده از گاستروانتریت کودکان در ایران اشاره کردند. یافته های آن ها در کنار نتایج Moshtagian و همکاران در سال ۲۰۱۶ لزوم شناسایی ترکیب های مهارکننده اختصاصی نظیر فروکتوز را برای کنترل این پاتوتایپ های شایع در سطح منطقه دوچندان می سازد (۱۲ و ۱۳).

Yin و همکاران در سال ۲۰۱۱ نیز به بررسی بیان ژن های مختلف و چسبندگی /شیرشیا کلی اینتروهموژنیک گونه $O_{157:H7}$ در روده خوک پرداختند. آن ها در این آزمایش با استفاده از محیط های با پایه لاکتوز و نمک صفراوی بیان ژن ها را با روش Real-Time PCR ارزیابی نمودند و مشخص شد که بیان ژن های *espD*، *eaeA* و همچنین ژن هایی که بر روی جزیره ژنومی LEE قرار دارند در حضور این مواد کاهش قابل توجهی دارند (۱۷). در

قندی، بیان ژن های ناحیه LEE را تحت تأثیر قرار می دهند. بنابراین، احتمال می رود که فروکتوز در این پژوهش از طریق تغییر در فعالیت پروتئین های تنظیمی کاتابولیک، منجر به خاموش شدن بیان ژن *eaeA* شده باشد. این امر حاکی از اهمیت شناسایی اثرهای ترکیب های غذایی بر کاهش یا افزایش شدت بیماری زایی پاتوتایپ EPEC می باشد و پتانسیل مداخله های تغذیه ای بر کنترل عفونت های EPEC را تقویت می کند. در مطالعه حاضر ترکیب قندی عسل یعنی تأثیر فروکتوز به تنهایی مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج از این نظر که نقش هم افزایی سایر ترکیب های موجود در عسل را نیز منتفی می کند و به ارزیابی نقش فقط فروکتوز می پردازد، حائز اهمیت است. نتایج نشان دهنده نقش معنی دار ($p < 0.05$) افزایش غلظت فروکتوز در کاهش هرچه بیشتر بیان ژن *eaeA* است که در اتصال باکتری به سلول اپی لیلال، کلونیزاسیون آن و ایجاد زخم اهمیت دارد، ضمن آنکه نیاز به پروبیوتیک ها و صرف هزینه بیشتر را نیز مرتفع می کند.

۵- نتیجه گیری

با توجه به یافته های مطالعه حاضر در صورت حساسیت افراد به مقادیر بالای فروکتوز در مواد غذایی و داروها می توان از غلظت های کمتر آن استفاده نمود. چنانچه نتایج تکمیلی سایر محققان اثر مثبت قند کتوزی فروکتوز بر کاهش بیماری زایی EPEC را با مهار فعالیت ژن *eaeA* تأیید نمایند؛ می توان از فروکتوز به عنوان راهکاری جدید جهت کاهش شیوع اسهال در کودکان و بزرگسالان استفاده نمود.

۶- ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر با کد اخلاق IR.IAU.B.REC.1402.029 به ثبت رسیده است.

۷- تشکر و قدردانی

نویسندگان از مسئولین آزمایشگاه میکروبیولوژی مولکولی دانشگاه آزاد واحد بروجرد کمال تشکر را دارند.

۸- تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که در پژوهش حاضر هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

مطالعه Kehl و همکاران در سال ۲۰۲۵ نیز بر اهمیت درک تنظیم بیان ژن های بیماری زای پاتوتایپ EPEC در جزایر LEE تأکید شده است (۱۸). این مطالعه ها با پژوهش حاضر که بیان ژن *eaeA* در حضور غلظت بالای فروکتوز (۳۴ درصد) به طور کامل مهار شد؛ هم خوانی دارد و احتمالاً ناشی از تأثیر فروکتوز بر پروتئین های تنظیم کننده و بیان ژن بیماری زای ژن *eaeA* می باشد. Mandal و همکاران در سال ۲۰۱۱ با مطالعه بر روی عسل به فعالیت ضد میکروبی آن اشاره کردند و علت آن را ناشی از محتوای قند بالا، اسیدیته، فعالیت کم آب، تولید پراکسید هیدروژن و مواد فرار با منشا گیاهی یا دیگر اجزای ناشناس غیر پراکسیدی دانستند (۱۹). Han و همکاران در سال ۲۰۲۵ پی به وجود یک عامل محیطی مهم مانند اکسیژن روده در تنظیم بیان ژن های ناحیه LEE و کلونیزاسیون پاتوتایپ $O_{157}:H_7$ باکتری EPEC بردند (۲۰). Liu و همکاران در سال ۲۰۲۲ نیز اهمیت ریوبولایین تولیدی توسط میکروبیوتای روده جهت تحریک بیان ژن های سیستم ترشحی نوع III و افزایش بیماری زایی را نشان دادند. این یافته ها تأثیر عوامل محیطی را در بیان ژن های بیماری زای EPEC نظیر *eaeA* مطابق مطالعه حاضر مورد تأکید قرار دادند (۲۱). Medellin-pena و همکاران در سال ۲۰۰۷؛ Karimi و همکاران در سال ۲۰۱۷؛ Rostami و همکاران در سال ۲۰۲۲ و نیز Bansal و همکاران در سال ۲۰۲۳ به بررسی اثر پروبیوتیک ها و میکروبیوتای روده بر بیان ژن های بیماری زای / شریشیا کلی گونه $O_{157}:H_7$ پرداختند و نتایج آن ها نشان دادند که پروبیوتیک لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتراروم می توانند منجر به کنترل بیان ژن های بیماری زای / شریشیا کلی و باعث غیرفعال شدن کلونیزاسیون در این باکتری شود و آن ها اثرهای بسزایی بر کاهش چسبندگی و بیان ژن *eaeA*، ایجاد رقابت غذایی، تولید ترکیب های ضد میکروبی و تعدیل سیستم ایمنی میزبان دارند (۲۲-۲۵). فروکتوز احتمالاً از طریق سیستم ترانسپورتر فسفوترانسفراز یا تأثیر بر روی تنظیم کننده های جهانی مثل CRP باعث سرکوب جزیره بیماری زایی LEE شده است (۲۶). نتایج مطالعه حاضر مبنی بر مهار بیان ژن *eaeA* در حضور غلظت های بالای فروکتوز، با یافته های Nakanishi و همکاران در سال ۲۰۱۱ هم خوانی دارد. آن ها نشان دادند که پروتئین های تنظیم کننده متابولیک مانند Cra که پیش تر FruR نامیده می شد در پاسخ به متابولیت های

۹- سهم نویسندگان

نگارش متن مقاله رضا یاری و نظارت نهایی و تأیید مقاله توسط محمدرضا مهرابی انجام شده است.

طراحی مطالعه و متدولوژی توسط محسن میرزایی، انجام آزمایش های آزمایشگاهی نسرین شاکرمی، تحلیل آماری و

۱۰- منابع

1. Mulu B.M, Belete M.A, Demlie T.B, Tassew H, and Sisay Tessema, T. Characteristics of Pathogenic *Escherichia coli* Associated with Diarrhea in Children under Five Years in Northwestern Ethiopia. Tropical Medicine and Infectious Disease. 2024;9(3): 1-15.
2. Ghorbani Moghaddam R, Asgharzadeh A, Amani A, Hosseinzadeh M.R, and Kasaian J. Evaluation of antibacterial effect of methanolic extract of *Verbascum thapsus* L. Ecotypes in North Khorasan against of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 2021;11(44), 41-56.
3. Kehl A, Bader L, Kaiping A.C, Kieninger B, Fritsch J, Mellmann A, and Mühlen S. Enteropathogenic *Escherichia coli* revisited – New insights into old EPEC isolates using whole genome sequencing. International Journal of Medical Microbiology. 2025;320:151659.
4. Ahmad O.M, Rukh S, Dos Santos Pereira S, Saran A, Chandran V.I, Muneeb A, et al. A comprehensive review of the role of virulence factors in enteropathogenic *Escherichia coli*-induced intestinal injury. Cureus. 2025;17(5): e83475.
5. Caravelli A, Luz D.E, Andrade F.B, Moraes C.T.P, Maranhão A.Q, and Piazza R.M.F. Sensitive and specific detection of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* using recombinant anti-intimin antibody by immunofluorescence assay. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2021;72(2): 268-278.
6. Machado A.M, Marto J, Gonçalves L.M, Ribeiro H.M, Duarte A, Tomás A, et al. Antimicrobial and wound healing effects associated to cytocompatibility and the relationship with phytochemical profile of selected Portuguese monofloral honeys. Journal of Food Composition and Analysis. 2025;144: 107659.
7. Ogwu M.C, and Izah S.C. Honey as a Natural Antimicrobial. Antibiotics. 2025;14(3): 255-284.
8. Singh R, Singh R, and Singh B. Comparison of four DNA extraction methods for detection of bacterial pathogens in fresh produce by quantitative PCR. Journal of Food Protection. 2020;83(7): 1184-1191.
9. Kim S.Y, Ahn Y.W, Kim J.K, Lee J.H, and Choi Y.S. Equivalence analysis for five Korean NCCP microorganism strains as ATCC reference strains alternative in Korean pharmacopoeia microbiological tests. Journal of Pharmaceutical Society of Korea. 2024;68(3):168-209.
10. Shokouhi Moghadam M, Kashef N, and Fani M. Evaluation of the effect of different carbohydrate sources on biofilm formation and virulence gene expression in Pathogenic Bacteria. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 2022;12(46): 25-38.
11. Najibi S, Bakhshi B, Fallahzad S, Pourshafie M, Katouli M, Sattari M, et al. Distribution of Class I Integrins Among Enteropathogenic *Escherichia coli*. Canadian Journal of Microbiology. 2012;58(5): 637-643.
12. Moradi M, and Rohani M. Molecular prevalence of virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from pediatric gastroenteritis. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 2023;13(50): 45-58.
13. Moshtagian F, Alipour M, and Yahyapour Y. Prevalence of *Escherichia coli* Pathotypes Among Children with Diarrhea in Babol, Northern Iran. International Journal of Enteric Pathogens. 2016;4(3): 1-36326.
14. Ahmadi F, Rastegar Lari A, Mostafavi M, and Esfahani A. An overview of diarrheagenic *Escherichia coli* in Iran: A systematic review and meta-analysis. Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench. 2015;8(3): 191-206.
15. Ahmadi F, Ghasemian A, Bakhshi H, Ghayoumi R, and Mirzazadeh A. Prevalence of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhea in Iran: A systematic review and meta-analysis. Iranian Journal of Pediatric Hematology and Oncology. 2016;6(4): 255-265.
16. Eybpoosh S, Mostaan S, Gouya M.M, Masoumi-Asl H, Owlia P, Eshtrati B, Montazer Razavi Khorasan M.R, and Bouzari S. Frequency of five *Escherichia coli* pathotypes in Iranian adults and children with acute diarrhea. PloS one. 2021;16(2): 1-13. e0245470.
17. Yin X, Zhu J, Feng Y, Chambers J.R, Gong J, and Gyles C.L. Differential gene expression and adherence of *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ in vitro and in ligated pig intestines. Plos one. 2011;6(2): 1-13. e17424.
18. Kehl A, Bader L, Kaiping A.C, Kieninger B, Fritsch J, Mellmann A, and Mühlen S. Enteropathogenic *Escherichia coli* revisited – New insights into old EPEC isolates using whole genome sequencing. International Journal of Medical Microbiology. 2025;320:151659.
19. Mandal M.D, and Mandal S. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2011;1(2): 154-160.

20. Han R, Qian Y, and Zheng C. A novel small RNA regulates Locus of Enterocyte Effacement and site-specific colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ in gut. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2025;14:1517328.
21. Liu B, Liu Y, Yang B, Wang Q, Liu X, Qin J, et al. *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ senses microbiota-produced riboflavin to increase its virulence in the gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2022;119(48):1-11.
22. Medellin-pena M.J, Wang H, Johnson R, Anand S, and Griffiths M.W. Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(13): 4259-4267.
23. Karimi S, Azizi F, Nayeab-Aghaee M, and Mahmoodnia L. The antimicrobial activity of probiotic bacteria *Escherichia coli* isolated from different natural sources against hemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Electronic Physician*. 2017;10(3): 6548-6553.
24. Rostami S, Fasihi M.A, Bagheri K, and Khodabakhshi B. 2022. Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* on adhesion and *eaeA* gene expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ and enteropathogenic *E. coli*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2023;21(1): 966-986.
25. Bansal T, and Sharma M. Gut microbiota-mediated defense against diarrheagenic *Escherichia coli* infections: A narrative review. *Microorganisms*. 2023;11(8): S39-S43.
26. Nakanishi N, Tashiro K, Kuhara S, Hayashi T, Sugimoto K, Tobe T. Regulation of virulence by sugars via the L-fucose pathway in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2011;193 (17): 4351-4360.