التحري عن حاملات الحديد *Siderophores* في جرثومتي *Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae* المعزولتين من حالات التهاب التجويف الانفي

أ.د. صبحي حسين خلف
كلية التمريض
جامعة الموصل

م.م.شاكر غازي جرجيس
كلية العلوم/ قسم علوم الحياة
جامعة الموصل

تاريخ تسليم البحث: ٢٠١١/٥/٢ ؛ تاريخ قبول النشر: ٢٠١١/٦/٢٣

ملخص البحث:

تم التحري عن قدرة عزلات *Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae* المعزولة من حالات التهاب التجويف الأنفي على إنتاج حاملات الحديد التي تعد أحد عوامل الضراوة الاساسية في احداث الاصابة استخدمت طريقة (Rrogers,1973) لاستخلاص حاملات الحديد ثم اجري الاختبار الكيميائي والحيوي للكشف عن حاملات الحديد,وأظهرت النتائج قابلية جميع العزلات المدروسة على انتاج حاملات الحديد مما يؤكد دورها في امراضية هذة الجراثيم.

Detection of siderophores from Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumonia Isolated from rhinitis cases.

Subhi H. Khalf
College of Nursing

Shaker G. Jarjees
Department of Biology
College of Science

Mosul University

Abstract:

The ability of *Staphylococcus aureus*,*Klebsiella.pneumoniae* isolated from rhinitis cases to produce siderophores as avirulence factor was estimated. Rogers method used for extraction of siderophores and then the chemical and biological assay performed to detect siderophore.The results showed ability of all strains to produce siderophores which confirmed its roles in pathogenesis.

المقدمة

يعد الحديد عنصراً ضرورياً ومحدداً لنمو البكتريا والاحياء المجهرية الاخرى اذ تُستخدم كعامل مؤكسد redox catalyst في البروتينات التي تساهم في عمليات نقل الالكترون في السلسة التنفسية كذلك يعد من اهم العناصر للبكتريا لغرض احداث الإصابة اذ يشارك في العديد من الوظائف الايضية (Jawetz etal., 2004; Griffiths, 1987; Sigel and Sigel, 1998)، في البيئات الهوائية ذات الرقم الهيدروجيني الفسيولوجي المتعادل يتواجد الحديد بشكل ايونات الحديدك (Fe^{+3}) وتكون ترسبات هيدروكسيدية واوكسي هيدروكسيدية غير ذائبة فاللبائن تواجه ظروف قلة الحديد وانعدامه بامتلاكها البروتينات السكرية ذات الفة عالية للارتباط بالحديد مثل الترانسفرين واللاكتوفرين التي تعمل على توفير عنصر الحديد لخلايا المضيف مع تحديد وتقليل الحديد الحر للمكروبات المرضية (Weinberg, 1999).

وعلى الرغم من أن جسم الانسان يحوي كمية كبيرة من الحديد، فان اغلب هذه الكمية غير قابلة للاستخدام من قبل الجراثيم، اذ ان تركيز الحديد الحر القابل للاستخدام يكون ضئيلاً لان اغلب الحديد المتوفر يكون مرتبطاً مع بروتينات الجسم المختلفة بحيث لا يدعم نمو البكتريا وتكاثرها (Braun etal., 1998; Murray etal., 1999; Barberis etal., 1986).

تحتاج البكتريا (٠.٤ – ٤) مايكرومول من الحديد الحر لغرض النمو وبما ان تركيز الحديد الحر في الدم واللمف وسوائل الجسم الخارج خلوية والافرازات الخارجية يكون قليلاً جداً بتركيز ١٠$^{-٨}$ مول/لتر، لذا تستخدم البكتريا طرائق واليات متعددة للحصول على الكمية المناسبة من الحديد لغرض النمو التكاثر ومنها امتلاك اغلب البكتريا انظمة امتصاص واطئة الالفة للحديد التي تمكن البكتريا من استخدام الاشكال المتعددة من الحديد على الرغم من قلة ذوبانية مركبات الحديد ثلاثية التكافؤ Fe^{+3} (Jawetz etal., 2004; Murray etal., 1999; Payne, 1993).

تحصل العديد من البكتريا على الحديد المرتبط ببروتينات المضيف من خلال صنع حاملات الحديد وافرازها Siderophores التي هي مركبات عضوية واطئة الوزن الجزيئي عالية الالفة للارتباط بالحديد اذ تتنافس مع خلايا المضيف لجذب الحديد من بروتينات المضيف (Clarke etal., 2001; Ratlage and Dover, 2000).

انعدام او قلة الحديد في البيئة الميكروبية يحفز الجرثومة على استنساخ الجينات التي تشفر للانزيمات المسؤولة عن صنع حوامل الحديد فضلا عن الى صنع مجموعة المستقبلات البروتينية المتخصصة للارتباط بـ Sideropheres الحامل للحديد (Peterson, 2000).

بعد ان يتم جذب الحديد من قبل حوامل الحديد تنقل هذه المعقدات التي تسمى بـ Ferru siderophore الى داخل الخلية البكتيرية عن طريق مستقبلات بروتينية متخصصة لحاملات الحديد في الغشاء الخارجي (Jawetz etal., 2004; Griffiths and Williams, 1999).

إن البروتينات المختلفة للغشاء الخارجي تشارك في نظام اخذ الحديد ونقله داخل الخلية، توجد اختلافات كبيرة ما بين الانواع البكتيرية في انظمة اخذ ونقل الحديد داخل الخلايا (Clarke etal., 2001).

ففي البكتريا سالبة الكرام انظمة النقل للحديد تتضمن مستقبلات بروتينية عالية الالفة للحديد التي توجد في الغشاء الخارجي للبكتريا هذه المستقبلات تعمل على انتزاع معقدات Ferru siderophores ونقلها عبر الغشاء الخارجي الى البلازم المحيطي (Buchanan etal., 1999) داخل البلازم المحيطي ترتبط هذه المعقدات ببروتينات البلازم المحيطي (Haag etal., 1994) التي ترتبط مباشرة بالنواقل البروتينية المعتمدة على ATP والمرتبطة بالغشاء وهذه النواقل تكمل عملية نقل الحديد الى داخل الخلية البكتيرية (Nikaido and Hall, 1998; Boss and Eppler, 2001).

اما في البكتريا موجبة الكرام فان معقدات Ferrisiderophores ترتبط بالبروتينات الدهنية الموجودة على سطح الخلية البكتيرية وبعد ذلك ترتبط بـ ABC transporters التي تكمل نقل الحديد الى داخل الخلية.

تحت ظروف قلة الحديد مثل بيئة المضيف البكتريا المعوية تصنع انواع مختلفة من حاملات الحديد التي تعود الى مجموعتين كيميائيتين مختلفتين، المجموعة الاولى تضم Phenolate-Type siderophore، والثانية هي مجموعة Hydroxamate-type siderophores (Griffiths etal., 1988).

تعد مجموعة Phenolate -Type siderophore أكثر شيوعاً ما بين افراد العائلة المعوية والتي تتمثل بمركب Enterochelin و Enterobactin وهو مركب ثلاثي الحلقات من 2, 3-hydroxy-benzoyl-serine ويعد هذا المركب نظام أخذ الحديد الرئيس للعائلة المعوية والتي تصنع من قبل اغلب العزلات السريرية لجرثومتي E. coil و Salmonella spp. (Griffiths, 1987).

اما حاملات الحديد من النوع الـ Hydroxamate فهي تضم مركبات Ferrichromes التي تصنع من قبل الفطريات، Ferriexamines، Aerobactin. ويعد Aerobactin اكثرها اهمية للبكتريا حيث تم اثبات دوره كعامل ضراوة في العديد من الجراثيم (de Lorenzo and Martinz, 1988).

يمتاز مركب Aerobactin بالثباتية العالية والذوبانية الجيدة اذ يعاد هذا المركب الى الخلية الجرثومية بعد كل دورة من دورات نقل الحديد من المضيف الى الجرثومة، اما الـ Enterobactin فانه يتحطم بانزيم الايستريز مباشرة بعد تحرر الحديد منه (Wooldridge and Williams, 1993) لكن اغلب السلالات لها القدرة على انتاج Enterobactin ونسبة قليلة من العزلات تنتج Aerobactin وهذا يدل على ان Enterobactin يعطي الجرثومة فائدة اضافية اذ يكون Enterobactin ذات الفة عالية لايونات الحديدك واكثر قابلية لسحب الحديد من الترانسفرين اما Aerobactin فتكون ذات الفة واطئة لايونات الحديدك واقل قدرة للتنافس مع الترانسفرين لجذب الحديد اذ يكون مصدر الحديد لـ Aerobactin هو خلايا المضيف (Griffiths, 1987; Brock etal., 1991).

اشار Martinz واخرون (١٩٨٧) الى ان اجناس العائلة المعوية تقسم الى مجموعتين اعتماداً على قدرتها على انتاج Aerobactin المجموعة الاولى تضم السلالات ذات المعدل الواطيء لانتاج Aerobactin وتضم اجناس Proteus، Serratia، Salmonella، المجموعة الثانية تضم السلالات ذات المعدل العالي لانتاج Aerobactin وتضم جنس E. coli.

اما جرثومة Klebsiella فانها تمتلك القدرة على انتاج النوعين من حاملات الحديد Aerobactin و Enterobactin (Podschun etal., 1992; Williams etal., 1987).

على الرغم من ان اغلب سلالات جرثومة الكلبسيلا لها القدرة على صنع الـ Aerobactin (Poschun etal., 1992) لكن لوحظ من النادر عزل السلالات المنتجة لـ Aerobactin من الحالات السريرية بغض النظر عن النوع او منطقة العزل (Williams & Carbontti,1986).

المواد وطرائق العمل

١ـ العزلات الجرثومية

استخدمت ٤٤ عزلة من جرثومة S.aureus و ٢٠ عزلة من جرثومة K.pneumoniae معزولة من حالات التهاب التجويف الانفي واجري تاكيدا لتشخيصها استنادا الى(Prescott (Baron & Finegold,1990;Collee etal.,1996:etal.,1996 ، حيث اجريت اختبارات التحري على العزلات التي ظهرت على شكل مستعمرات وردية مخاطية مخمرة لسكر اللاكتوز على وسط الماكونكي وعلى العزلات التي ظهرت على شكل مستعمرات دائرية كبيرة ذهبية اللون كريمية القوام التي شملت صبغة كرام،اختبار فعالية انزيم السايتوكروم والكتاليز.كما اجريت العديد من الاختبارات الكيموحيوية اللازمة لتشخيص الجرثومتين .

٢ـ اختبار التحري عن انتاج حاملات الحديد Siderophores

أ- استخلاص حاملات الحديد

استخدمت طريقة (Rogers,١٩٧٣) لاستخلاص حاملات الحديد من جرثومتي K. pneumoniae, S. aureus المعزولتين من المرضى المصابين بالتهاب الانف الحاد والمزمن من مستشفيات السلام، الزهراوي التعليمي على مدى سبعة اشهر من شهر ايلول (٢٠٠٤) ولغاية شهر نيسان (٢٠٠٥).

تم تلقيح العزلات بعد تشخيصها في (١٠٠) سم^3 من الوسط الادنى ذات العوز للحديد Tris minimal suc<cinate medium المحضرة في الفقرة (٣-١-٩) والمضاف اليها المكونات الاتية : احماض امينية casaamino acid 1%، حامض البانتوثينك (٠.٥) مايكروغرام/سم^3، بايوتين (٠.٠١) مايكروغرام/سم^3، ثايمين (٥٠) مايكرومولار، كلوريد الكالسيوم (١٠٠) مايكرومولار وبدون اضافة الكلوكوز والحديد. حضن الوسط بدرجة (٣٧)^{o}م ولمدة (٢٤) ساعة، جمعت الخلايا الجرثومية بوساطة الطرد المركزي المبرد الفوقي بسرعة (11000 g) بدرجة (٤)^{o}م. اخذ الطافي Supernant من المزرعة الجرثومية واضيف اليه (٤٠)سم^3 من خلات الاثيل Ethyl acetate لغرض تحميضه Acidifed وتم تبخير الخلات باستخدام جهاز المبخر الدوار Rotary evaporator vacuum وتم الحصول على المستخلص الخام Crude extract للتحري عن حاملات الحديد، اذيب المستخلص في (٤٠٠) مايكروليتر من ماء مقطر معقم بالترشيح لغرض استخدامه في الاختبارات الكيميائية والحيوية، علماً ان الماء المستخدم في هذه الاختبارات خالٍ من الايونات.

ب- الاختبار الكيميائي للكشف عن حاملات الحديد Siderophores chemical assay

العديد من حاملات الحديد تكون معقدات لونية مع الحديد، لذا يمكن الكشف عن حاملات الحديد من خلال تكوين معقدات لونية بعد اضافة الحديد الى المحلول الطافي من المزرعة الجرثومية (Clark and Bavoil, 1997).

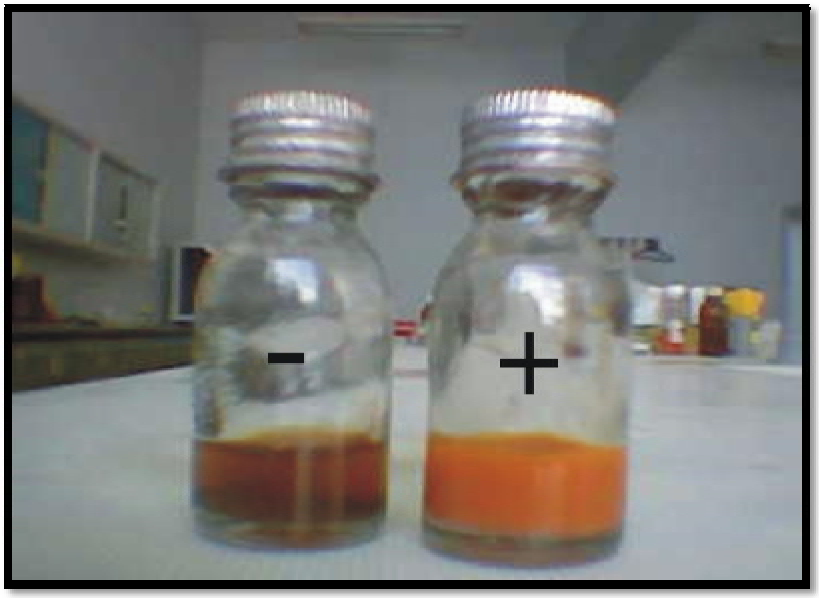
استخدمت طريقة اختبار بروكلورايت الحديديك Ferric perchlorate assay التي تتضمن مزج (٠.٥) سم^3 من الطافي من المزارع الجرثومية مع (٢.٥) سم^3 من كاشف بيروكلورايت الحديديك المحضر من (٥) مولار من $Fe(ClO_4)_3$ في (٠.١) مولار $HClO_4$. ظهور اللون البرتقالي الى الارجواني يدل على وجود حاملات الحديد في المحلول أي قدرة البكتريا على انتاج هذه العوامل التي تعمل على جذب الحديد من بروتينات المضيف (Atkin etal., 1970).

ج- الاختبارات الحيوية للتحري عن حاملات الحديد Siderophores Bioassay

تم تلقيح الوسط الادنى الخالي من ايونات الحديد Iron-deficient minimal medium الحاوي على (٢٥) مايكرومول من مادة Ethyl diamine-di(o-hydroxy phenol acetic acid) (EDDHA) المخلبية التي تعمل على ازالة الحديد المتبقي من الوسط بتركيز (10^{4}) من العزلات البكتيرية الفتية قيد الدراسة، ثم وزعت اقراص مشبعة بالمستخلص الخام الحاوي على حاملات الحديد المحضرة بطريقة (Rogers, 1973) على سطح الوسط الزرعي وحضنت بدرجة (٣٧)^{o}م ولمدة (٢٤) ساعة، بعد انتهاء فترة التحضين تم تقييم حدوث النمو الكثيف حول الاقراص التي تدل على النتيجة الموجبة لهذا الاختبار أي وجود حاملات الحديد في المستخلص الخام (Sebulsky etal., 2000; Clarke and Bavoil, 1997) . كما اجري اختبار سيطرة لاثبات ان العامل المحفز لنمو الجراثيم حول الاقراص المشبعة بالمستخلص الخام هو حاملات الحديد وليس مكونات الوسط الادنى من الفيتامينات والاملاح. اذ تم الحصول على المستخلص الخام من الوسط الادنى Minimal medium لوحده بدون وجود الجراثيم، ثم حضرت اقراص مشبعة بالمستخلص الخام وثبتت على الوسط الزرعي الادنى الملقح ايضاً بتركيز (10^{4}) من الخلايا الجرثومية قيد الدراسة وحضن الوسط بدرجة (٣٧)^{o}م لمدة (٢٤) ساعة، عدم ظهور نمو كثيف حول الاقراص يكون دليلاً على ان العامل المحفز لنمو الجراثيم هو حاملات الحديد وليس مكونات الوسط الادنى (Sebulsky etal., 2000).

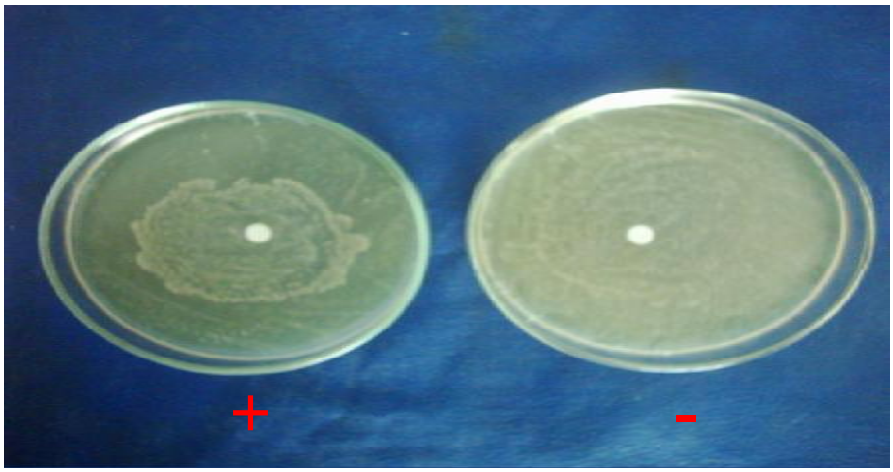
النتائج والمناقشة

استخدمت طريقة بروكلورايت الحديديك Ferric perchlorate assay للتحري كيميائياً عن حاملات الحديد واظهرت النتائج قابلية كل العزلات التابعة لجرثومتي Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae على انتاج حاملات الحديد اذ كانت نسبة الانتاج ١٠٠% التي تم الاستدلال عنها بظهور اللون البرتقالي–الارجواني (صورة رقم١) نتيجة لتفاعل الحديد مع حاملات الحديد المتواجدة في راشح المزرعة الجرثومية المستخلصة بطريقة (Rogers, 1973).



صورة (١) اختبار Ferric perchlorate يوضح قدرة جرثومة S. aureus على انتاج حاملات الحديد

كما استخدمت طريقة الباحث (Sebulsky etal., 2000) كاختبار حيوي تاكيدي لوجود حاملات الحديد واجري الاختبار واوضحت النتائج قدرة العزلات قيد الدراسة على انتاج حاملات الحديد اذ حصل نمو بكتيري كثيف حول الاقراص المشبعة بالمستخلص الخام الحاوي على حاملات الحديد الصورة (٢)مما يدل على وجود حاملات الحديد في المستخلص الخام كما اظهرت النتائج عدم حدوث تحفيز للنمو البكتيري حول الاقراص المشبعة بمستخلص الوسط الزرعي الادنى بدون الجراثيم كاختبار سيطرة مما يؤكد ان تحفيز النمو البكتيري حول الاقراص يعود الى وجود حاملات الحديد وليس بسبب تحفيز مكونات الوسط الزرعي الغني بالفيتامينات والاحماض الامينية والمغذيات المشجعة لنمو البكتريا.



صورة (٢) : اختبار حيوي Bioassay يبين قدرة عزلات جرثومة *K. pneumoniae* قيد الدراسة على انتاج حاملات الحديد

اتفقت نتائج هذه الدراسة مع دراسةPodschun واخرين (1992) الذين وجدوا ان عزلات K. pneumoniae و K. oxytoca المعزولة من الحالات السريرية كانت منتجة لحاملات الحديد وبنسب عالية (٩٨.٨%)، (٩٩.٤%) من العزلات كانت منتجة لـ Enterobactin، اما العزلات المنتجة لـ Aerobactin فكانت بنسبة (٤%) لجرثومة K. oxytoca و (٦%) من عزلات K. pneumoniae وهذا يؤكد على ان انتاج حاملات الحديد من نوع Aerobactin لا تعد الوسيلة الرئيسة للجرثومة في اخذ الحديد ونزعه من بروتينات المضيف او من البيئة الخارجية لذا لا يعد انتاج Aerobactin كعامل ضراوة مهم للجرثومة في احداث الخمج.

واتفقت نتائج الدراسة مع دراسة Podschun واخرين(2000) الذين اشاروا الى ان انتاج حاملات الحديد تعد أحد عوامل الضراوة للجرثومة خاصة في البيئات قليلة المحتوى الغذائي من الحديد مثل بيئة المضيف اذ يكون الحديد مرتبطاً مع بروتينات المضيف مثل اللاكتوفرين والترانسفرين اذ وجد الباحث ان (٩٢) عزلة بنسبة (١٠٠%) من جرثومةK. Planticola كانت منتجة لـ Enterobactin و (٢٠٥) عزلة بنسبة (٩٩%) من جرثومة K. pneumoniae كانت منتجة لـ Enterobactin وايضاً اتفقت نتائج الدراسة مع دراسة (Podschun etal., 2001) الذي استنتج بان (٩٩%) من عزلات K. pneumoniae كانت منتجة لحاملات الحديد من كلا النوعين كاحد عوامل الضراوة.

اشارت الدراسة الحالية الى ان عزلات K. pneumoniae المعزولة من حالات التهاب التجويف الانفي كانت منتجة لحاملات الحديد وهذا يؤكد على اهمية العوامل في جذب الحديد من البروتينات المتواجدة في افرازات الانف مثل اللاكتوفرين التي تكون ذات الفة عالية للارتباط بالحديد لذا تعد حاملات الحديد لهذه العزلات عوامل ضراوة تساعدها على مواجهة ظروف البيئة الخارجية ذات المحتوى الواطيء من الحديد مما يساعد على البقاء بصورة نشطة بالاعتماد على الحديد المرتبط ببروتينات المضيف في ادامة فعاليتها الايضية وانتاج عوامل الضراوة واحداث الاصابة.

واكد الباحثان Nassif و SanSonetti (1986) على وجود علاقة مترابطة ما بين ضراوة جرثومة K. pneumoniae وقدرة هذه السلالات على صنع الـ aerobactin اذ تناول الباحثان قطعة الجين المسؤولة عن صنع Aerobactin من السلالات المصلية K1 و K2 ونقلت الى سلالات غير منتجة لحاملات الحديد وبعد عملية النقل والتحول الجيني لوحظ زيادة ضراوة هذه السلالات في الحيوانات المختبرية.

واكد الباحث Williams وCarbonetti (1986) على دور حاملات الحديد Enterobactin والـ Aerobactin كعوامل ضراوة مهمة للعديد من سلالات E. coli في احداث الاخماج خارج المعوية Extra intestinal infection.

المصادر

Jawetz, E., Brooks, G. F., Butel, J. S. and Morse, S. A. (2004). Jawetz Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 23rd ed. McGraw Hill Com., Singapore.

Griffiths, E. (1987). The iron-uptake systems of pathogenic bacteria, p. 69 – 137. In Bullen, J. J. and Griffiths, E. (ed.), Iron and Infection.. John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y.

Sigel, A. and Sigel, H. (1998). Metal ions in biological systems. P 1 – 29, Marcel dekker. Inc. New York. N. Y. p. 1 – 29.

Weinberg, F. D. (1999). Acquistion of iron and other nutrient vivo, P. 79 – 93. In. Roth, J. A., Botm, C. A., Brogden, K. A., Minion, E. C. and Wannemuehler, M. E. (ed). Virulance mechanisms of bacterial pathogens. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Braun, V., Brazel-Faisst, C., and Schneider, R. (1998). Growth stimulation of Escherichia coli in serum by iron (III) aerobactin, Recycling of aerobactin. FEMS Microbiol. Lett., 21 : 99 – 103.

Murray, P. R., Baron, E. J., Tenover, F. C. and Yolken, R. H. (1999). Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. American society for Microbiology : Asm press. Washington. D. C. pp. 80 – 82.

Barberis, L. I., Eraso, A. J., Pjaro, M. C. and Albesa, I. (1986). Molecular weight determination and partial characterization of Klebsiella pneumoniae hemolysins. Can. J. Microbiol., 32 :884 – 888.

Payne, S. M. (1993). Iron acquistion in microbial pathogenesis. Trend Microbiol., 1, 66 – 69.

Clarke, T. E., Tari, L. W. and Vogel, H. J. (2001). Structural biology of bacterial iron uptake systems. Curr Top Med Chem., 1 (1) : 7 – 30.

Ratlage, C. and Dover, I., G. (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. A. Rev. Microbiol., 54 : 881 – 941.

Peterson, J. W. (2000). Chapter 7 : Bactrial pathogenesis. Baron's medical microbiology, 4th ed. University of Texas. Medical Branch. Available at. WWW.Fb4d.com.

Griffiths, E., and Williams, P. (1999). The iron-uptake systems of pathogenic bacteria, Fungi and protozoa, P. 87 – 212. In Bullen, J. J., Griffiths, E., (ed), Iron and infection, 2nd ed, John Wiley and Sons, Ltd., New York. N. Y.

Buchanan, S. K., Smith, B. S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnikar, M., Chakraborty, R., Vander Heolm, D. and Deisenhofer, J. (1999). Crystal structure of the outer member active transportation, fop a from Echerichia coli. Nat. Struct. Biol., 6 : 56 – 63.

Haag, H., Fiedler, H. P., Meiwes, J., Drechsel, H. Jung, G. and Zaher, H. (1994). Isolation and biological characterization of staphyloferrin B. a compound with siderphore activity from staphylococci. FEMS. Microbiol. Lett., 115 : 125 – 130.

Nikaido, H., and Hall, J. A. (1998). Overview of bacterial ABC transporters. Methods Enzymol., 292 : 3 – 20.

Boos, W., and Eppler, T. (2001). Prokaryotic Binding Protein-Dependent ABC Transporters, p. 77 – 114. In Winkelmann, G. (ed.), Mirobiol Transport Systems. Wiley-VCH. Weinherin, Germany.

Griffiths, E., Chert, H., and Stevenson, P. (1988). High-affinity iron uptake systems and bacterial virulence, p. 121 – 137. In Roth, A. (ed.), Virulence mechanisms of bacterial pathogens. American Society for Microbiology, Washington D. C.

deLorenzo, V., and Martinz, J. L., (1988). Aerobactin production as a virulence factor : a recvaluation. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 7 : 621 – 629.

Wooldridge, K. G. and Williams, P. H. (1993). Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. FEMS. Microbiol. Rev., 12 : 325 – 348.

Brock, J. H., Williams, P. H., Liceaga, J. and Wooldridge, K. G. (1991). Relative availability of transferrim-bound iron and cell-derived iron to aerobactin-producing and enterobactin-producing strains of Escherichia coli and to other microgranisms. Infect. Immun. 59 : 3185 – 3190.

Podschun, R. Fischer, A., and Ullmann, U. (1992). Siderophore production of Klebsiella species isolated from different sources. Zntbl. Bakteriol., 276 : 481 – 486.

Williams, P. Chart, H., Griffths, E., and Stevensen, P. (1987). Expression of high affinity iron uptake systems by clinical isolates of Klebsiella. FEMS Microbiol. Lett., 44 : 401 – 412.

Williams, P., Smith, M.A, Stevenson, P., Griffths, E., Tomas, J.M.T. (1989). Novel aerobactin receptor in Klebsiella pneumoniae. J. Gen. Microbiol., 135 : 3173 – 3181.

Rogers, H. J. (1973). Iron-binding catechols and virulence in Escherichia coil. Infect. Immun., 7 : 447 – 456.

Clarke, V.L. and Bavoil, P. M. (1997). Bacterial Pathogenesis Harcourt Brace and Company, Academic Press, California, pp. 123 – 133.

Atkin, C. L., Neilands, J. B. and Phaff, H. J. (1970). J. Bacteriol. 103, 722. In Clark, V.L. and Bavoil, P.M. (1997). Bacterial Pathogenesis Harcourt Brace and Company, Academic Press, California.

Sebulsky, M. T., Hohnstein, D., Hunter, M. D., Heineriches, D. E. (2000). Identification and characterization of a membrane permease

involved in iron-hydroxamate transport in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 182 (16) : 4394 – 4400.

Podschun, R., Fisher, A. and Ullmann, U. (2000). Expression of putative virulence factors by clinical isolates of Klebsiella planticola. J. Med. Microbiol., 99 : 115 – 119.

Podschun, R., Fisher, A. and Ullmann, U. (2001). Characterisation of Hafina alvei isolates from human clinical extra intestinal speciemense harmagglutinin, serum resistance siderophore synthesis. J. Med. Microbiol., 50 : 208 – 214.

Nassif, X., and Sansonetti, P. J. (1986). Correlation of the virulence of Klebsiella pneumoniae K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. Infect. Immun. 54 : 603 – 608.

Williams, P. H. and Carbonetti, N. H. (1986). Iron, siderophores, and the pursuit of virulence : independence of the aerobactin and enterochelin iron uptake systems in Escherichia coli., 51 (3) : 942 – 947.