مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هجدهم، شماره ۳، اسفند ۱۳۹۴، صفحه ۶۸-۶۲

فراوانی ژنهای حدت در انتروکوک فکالیس جدا شده از نمونه‌های مدفوع با روش Multiplex- PCR

فاطمه کاظمینی (MSc)[۱]، کیومرث امینی (PhD)*[۱]

۱-گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی

دریافت: ۹۴/۶/۹، اصلاح: ۹۴/۷/۶، پذیرش: ۹۴/۱۰/۱۶

خلاصه

سابقه و هدف: انتروکوک فکالیس (Enterococcus fecalis) به عنوان عامل ایجاد عفونت‌های بیمارستانی دارای فاکتورهای بیماریزایی است که در کلونیزاسیون، مقاومت به سیستم ایمنی، رقابت با سایر میکروارگانیسم ها و ایجاد آسیب بواسطه تولید فاکتورهای ترشحی دخالت دارند. هدف این مطالعه بررسی عوامل حدت در انتروکوک فکالیس جدا شده از نمونه‌های مدفوعی به روش Multiplex-PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، تعداد ۲۰۰ نمونه مدفوع از مراکز درمانی کرمان جمع‌آوری و با کشت در محیط اختصاصی از جمله KF استرپتوکوک‌آگار و انجام آزمون‌های بیوشیمیایی، تعداد ۶۰ نمونه انتروکوک فکالیس شناسایی گردید. جهت شناسایی ژنهای حدت از آزمون Multiplex-PCR استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که میزان آلودگی به باکتری انتروکوک فکالیس در زنان ۵۲ درصد و در مردان ۴۸ درصد می‌باشد. همچنین شیوع ژنهای حدت در زنان بیشتر از مردان بود. بیشترین فراوانی را ژن asa1 (۸۰/۶ ٪) و کمترین فراوانی در ژن cylA (۱۶/۱ ٪) شناسایی شد. ژن hyl در هیچ یک از نمونه‌ها ردیابی نگردید.

نتیجه گیری: میزان فراوانی انتروکوکوس فکالیس در جمعیت زنان بیشتر بوده که با توجه به ساختار دستگاه ادراری و متعاقباً عفونت‌های ادراری مکرر در زنان، بروز ژنهای حدت با فراوانی بیشتری در زنان مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: انتروکوک فکالیس ، ژنهای حدت، واکنش زنجیره ای پلی مراز.

مقدمه

انتروکوک‌ها باکتریهای گرم مثبت بی‌هوازی اختیاری بوده که بطور طبیعی فلور ساکن دستگاه گوارش انسان می باشند که به عنوان پاتوژن‌های مهمی در سراسر جهان به ویژه در عفونت‌های بیمارستانی شناخته شده‌اند (۱). موفقیت این باکتری در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی به فاکتورهای بیماریزایی آن بستگی دارد، که در کلونیزاسیون میکروارگانیسم، مقاومت به سیستم ایمنی، ایجاد رقابت با سایر میکروارگانیسم ها و نیز ایجاد آسیب بواسطه تولید فاکتورهای ترشحی و غیره دخالت دارند. انتروکوک‌ها عفونت‌های خطرناکی همچون باکتریمی، سپتی سمی، عفونت ادراری، مننژیت، عفونت زخم و غیره به خصوص در شرایطی مثل تخریب پوست، سرکوب و یا نقص سیستم ایمنی، بستری شدن طولانی مدت در بیمارستان و حتی استفاده بی‌رویه از آنتی بیوتیک‌ها ایجاد می‌کنند (۳و۲). انتروکوک‌ها در مقایسه با باکتریهایی نظیر استرپتوکوکوس و استافیلوکوکوس از قدرت بیماریزایی کمتری برخوردار می‌باشند (۴). با تحقیقات بیشتر عوامل بیماریزایی در این باکتری شناخته شده است که هر کدام از این فاکتورها نقش ویژه‌ای در ایجاد بیماری ناشی از این باکتری دارند (۵). عوامل بیماریزایی همچون همولیزین- سایتولیزین که حدود ۳۰ درصد از گونه‌های انتروکوک فکالیس واجد آن بوده و بر روی پلاسمیدهای پاسخ به فرومون و یا جزایر پاتوژنیسته کدگذاری و سبب لیز گلبول های قرمز و سفید می‌گردد (۶). ژلاتیناز سبب آسیب به بافت میزبان و کاهش پاسخ سیستم ایمنی شده و در فعال نمودن اتولیزین‌ها و تخریب پپتیدوگلیکان و متعاقب آن آزاد شدن DNA و تشکیل بیوفیلم نقش دارد (۷). هیالورونیداز سبب تخریب هیالورونیک اسید شده و در انتشار باکتری در محل عفونت اولیه نقش مهمی ایفا می‌نماید (۸). پروتئین Aggregation Substance (ماده تجمعی) که حامل ژن asa1 در انتروکوک‌ها است در پاسخ به فرمونهای جنسی تولید شده که باعث جذب این باکتری ها به یکدیگر و ایجاد توده سلولی می‌گردد. همچنین این ماده نقش مهمی در تحریک چسبندگی، تهاجم به سلول و تخریب بافت های میوکارد و ریه ایفا می‌کند (۱۱-۹). پروتئین سطحی انتروکوکی (ESP) وظایف تقریبا مشابه با ماده تجمعی دارد (۱۲). عامل اتصال به کلاژن در اتصال باکتری به کلاژن و لامینین سلولی نقش داشته و موتاسیون در آن سبب کاهش ایجاد اندوکاردیت و عفونت ادراری می شود (۱۳). Richards و همکاران گزارش کردند که این باکتری نقش عمده‌ای در ایجاد عفونتهای ادراری، عفونتهای جراحی و خون دارد (۱۴). گونه غالب در ایجاد این

▣ این مقاله حاصل پایان نامه فاطمه کاظمینی دانشجو کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه می باشد
* مسئول مقاله: دکتر کیومرث امینی
آدرس: ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی ساوه، گروه میکروبیولوژی. تلفن: ۰۸۶-۴۲۲۴۱۵۱۱
E-mail: kamini@iau-saveh.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.9.3]
[DOI: 10.22088/jbums.18.3.62]

عفونتها گونه انتروکوک فکالیس مقاوم به ونکومایسین می‌باشد (۱۵). در تحقیقی بیشترین فراوانی مربوط به ژنهای ژلاتیناز و همولیزین در بین انتروکوک‌ها گزارش شده است (۱۶). انتروکوک فکالیس‌های واجد ژن ژلاتیناز در حدود ۹۳ درصد مربوط به بیماران مبتلا به اندوکاردیت شناسایی گردیده است (۱۷). در نروژ ۲۹ درصد از کودکان مبتلا به انتروکوک فکالیس حاوی ژن سیتولیزین و ۴۸ درصد ژلاتیناز مثبت گزارش شده اند(۱۸). Eaton و همکاران به این نکته اشاره می‌نمایند که انتروکوک فکالیس جدا شده از نمونه‌های کلینیکی نسبت به نمونه‌های مواد غذایی دارای ژنهای حدت بیشتری می‌باشند (۱۹).

در مطالعه‌ای که در ایران انجام گرفت، هیچ فاکتور منفرد غالب به عنوان پیشگویی کننده مهم حدت معرفی نشده و آسیبهای ناشی از این باکتری به اثرات تجمعی آنها نسبت داده شده است (۲۰). در نتایج محققین سایر کشورها بیشترین فروانی از نظر وجود ژنهای حدت، ژنهای esp و hyl گزارش شده‌اند(۲۱). در تحقیق Chow و همکاران تولید سیتولیزین بیشتر از بیماران مبتلا به اندوکاردیت جداسازی شده است (۲۲).

همولیزین در مدل های حیوانی به عنوان فاکتور ویرولانس مطرح شده است. در یک مطالعه بر روی رت، بیشترین میزان مرگ و میر در ارتباط با سویه های دارای فاکتور همولیزین (سیتولیزین) ذکر شده است (۲۳). Kreft و همکاران، دخالت فاکتور تجمعی را در اتصال انتروکوک‌ها به سلولهای کلیه نشان دادند و پیشنهاد نمودند که این فاکتور احتمالاً در پاتوژنز این دسته از باکتریها دخیل است (۲۴). در مطالعه‌ای در ایران حضور فاکتور تجمعی در گونه های جدا شده از موارد بالینی بسیار شایع تر از ایزوله های کنترل بود (۲۵). هدف از انجام این مطالعه بررسی برخی از عوامل بیماریزایی و فراوانی ژنهای gelE. cylA. hyl.esp asa1. در انتروکوک فکالیس جدا شده از نمونه‌های مدفوعی به روش Multiplex-PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها و جداسازی: در این مطالعه توصیفی- تحلیلی، با استفاده از فرمول حجم نمونه و سطح اطمینان ۹۵٪ و خطای قابل قبول ۰/۰۵، تعداد ۲۰۰ نمونه مدفوع از بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی کرمان از خرداد تا آذر ماه ۱۳۹۳جمع آوری شد. این نمونه‌ها جهت کشت بر روی محیط‌های بلادآگار، مک-کانکی آگار، KF استرپتوکوک آگار انتقال داده شده و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون گردیدند. کلونی‌های رشد یافته با آزمون‌های بیوشیمیایی از جمله هیدرولیز آسکولین، رشد در محیط NaCl، هیدرولیز هیپورات، تخمیر قند سوربیتول شناسایی و در نهایت تعداد ۶۰ نمونه باکتری انتروکوک فکالیس تایید گردید. معیار تأیید جدایه‌های انتروکوک، ویژگی‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی این باکتری بود، نمونه‌های اخذ شده در محیط‌های اختصاصی بررسی و جهت تأیید تشخیص از تست‌های بیوشیمیایی استفاده شد. پس از تشخیص، نمونه‌هایی که خصوصیات بیوشیمیایی آنها با ویژگی‌های انتروکوک فکالیس منطبق بود به عنوان نمونه مثبت شناسایی شدند (۲۶).

استخراج DNA و آزمون Multiplex-PCR: برای استخراج DNA از کیت استخراج باکتریهای گرم مثبت سیناژن (Cinna Pure DNA KIT-PR881614) استفاده گردید. بعد از استخراج DNA غلظت آن با دستگاه فتومتر (eppendorff) اندازه‌گیری و برنامه آزمون Multiplex-PCR انجام گرفت (جدول ۱). مرحله دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه (تعداد ۳۵ سیکل)، مرحله بسط نهایی $72^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه می‌باشد (۲۷).

مخلوط مواد استفاده شده جهت انجام واکنش Multiplex-PCR شامل: آب مقطر ۹/۶ میکرولیتر، 10X. PCR buffer به میزان ۲ میکرولیتر، MgCl2 1.5mM به میزان ۰/۸ میکرولیتر، (dNTP mix 5Mm) به میزان ۰/۸ میکرولیتر، پرایمرهای با غلظت ۱۰pm/µl مورد استفاده هرکدام ۱/۵ میکرولیتر، آنزیم Taq unit ۲/۵ polymerase به میزان ۰/۳ میکرولیتر، نمونه DNA ۴ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر می باشد (۲۷). آزمون Multiplex-PCR در دستگاه TECHNE انجام و جهت بررسی محصول Multiplex-PCR نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ انتقال داده شده و بعد از رنگ‌آمیزی در دستگاه ژل داک BIORAD مورد بررسی قرار گرفت.

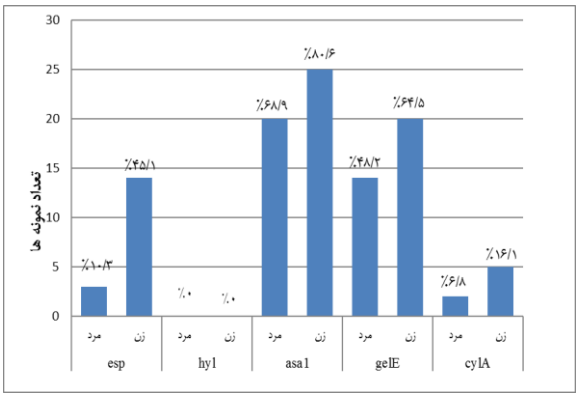
جدول۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

ژن	عوامل حدت	نام پرایمر	توالی نوکلئوتید('3 to 5')	طول محصول bp	منبع
asa1	Aggregation substance	ASA1-F	GCACGCTATTACGAACTATGA	۳۷۵	(۲۷)
		ASA1-R	TAAGAAAGAACATCACCACGA		
gelE	Gelatinase	GEL-F	TATGACAATGCTTTTTGGGAT	۲۱۳	(۲۷)
		GEL-R	AGATGCACCCGAAATAATATA		
cylA	Cytolysin	CYT-F	ACTCGGGGATTGATAGGC	۶۸۸	(۱۷)
		CYT-R	GCTGCTAAAGCTGCGCTT		
esp	Enterococcal surface protein	ESP-F	AGATTTCATCTTTGATTCTTGG	۵۱۰	(۲۸)
		ESP-R	AATTGATTCTTTAGCATCTGG		
hyl	Hyaluronidase	HYL-F	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG	۲۷۶	(۸)
		HYL-R	GACTGACGTCCAAGTTTCCAA		

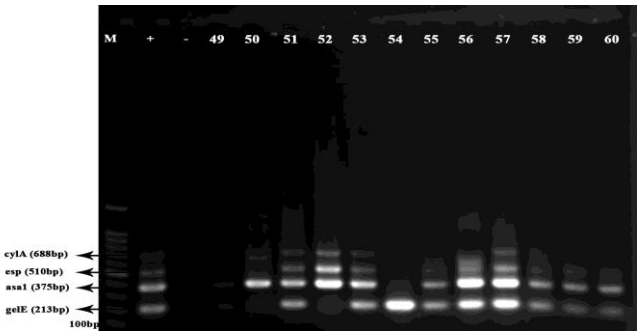
[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.9.3]
[DOI: 10.22088/jbums.18.3.62]

یافته ها

نتیجه آزمایش PCR چندگانه‌ای جهت شناسایی ژنهای gelE. cylA. hyl.esp asa1. مشخص نمود که در ۶۰ جدایه مورد مطالعه به ترتیب بیشترین فراوانی مربوط به ژن asa1 ۴۵ مورد (۷۵ ٪)، ژن gelE ۳۴ مورد(۵۶/۶٪)، Esp ۱۷ مورد (۲۸/۳٪)، cylA ۷ مورد(۱۱/۶٪) می‌باشد. ژن hyl در هیچ یک از نمونه‌ها ردیابی نگردید. همچنین توزیع فراوانی ژنهای حدت باکتری انتروکوک فکالیس جداسازی شده در بیماران به تفکیک جنس مشخص نمود که بیشترین فراوانی باکتری انتروکوک فکالیس در جمعیت زنان مشاهده شده است(۵۲ ٪ زن در مقابل ۴۸٪ مرد) توزیع ژنهای ردیابی شده در مجموع نمونه‌های مثبت به تفکیک جنس مشخص نمود که فراوانی کلیه ژنهای مورد بررسی در زنان بیشتر از مردان گزارش شده و دارای اختلاف معنی داری بوده که با فراوانی بیشتر ردیابی گردید (نمودار ۱). نتایج حاصل از شناسایی مولکولی ژنها و محصول PCR بر حسب طول محصول (bp) در شکل۱ ذکر شده است.



نمودار۱. توزیع فروانی ژنهای حدت انتروکوک فکالیس ردیابی شده به تفکیک جنسیت



شکل ۱. نتیجه آزمایش PCR بر روی تعدادی از جدایه‌ها، به ترتیب از چپ به راست: مارکر ۱۰۰ bp ، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه‌های جداسازی شده، طول باند هریک از ژنها در تصویر ذکر شده است.

بحث و نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که میزان آلودگی به باکتری انتروکوکوس فکالیس در زنان ۵۲ درصد بوده که در مقایسه با مردان دارای فراوانی بیشتر می باشد که این میزان آلودگی به خصوص در زنان نقش مهمی در بیماریزایی دارد. همچنین در این مطالعه میزان فروانی ژنهای حدت به دنبال آلودگی بیشتر در زنان بیشتر از مردان گزارش شد که به نظر می‌رسد یکی از دلایل این افزایش، مصرف بیشتر آنتی‌بیوتیک در زنان بوده که موجب فراوانی بیشتر باکتری انتروکوک فکالیس و متعاقباً حضور ژنهای حدت این باکتری شده است. فاکتورهای ویرولانس در انتروکوکوس فکالیس شامل ترکیبات aggregation (Agg)، پروتئین سطحی انتروکوک (Esp)، همولیزین (hyl) که دارای فعالیت باکتریسیدال، همولیتیک بوده و آنزیم ژلاتیناز است (۱۱). نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر و فراوانی ژنهای حدت این باکتری نشان دهنده حضور فعال این ژنها در بیماریزایی انتروکوک فکالیس می‌باشد. با تاکید بر این نکته که تاکنون هیچ توکسین پروتئینی در انتروکوک‌ها شناسایی نشده است، احتمالاً بیماریزایی آن به واسطه فعالیت مجموعه‌ای از فاکتورها و آنزیم های تولیدی باکتری، مقاومت آنتی بیوتیکی و فاکتور تجمعی شرکت کننده در تبادل پلاسمیدی صورت می پذیرد (۲۹). نتایج تحقیق Mozafari و همکاران نشان داد که فرکانس تولید فاکتورهای ویرولانس همولیزین، ژلاتیناز، هماگلوتینین، دزوکسی ریبونوکلئاز و تولید فرمون یا فاکتور تجمعی در گونه های فکالیس بیشتر از گونه-های فاسیوم بوده است (۲۵). در بررسی Ghasemi و همکاران از ۹۵ سویه انتروکوکوس فکالیس، ۱۹ سویه آنزیم ژلاتیناز تولید نمودند. ۴۲ سویه دارای همولیز بودند و ۵۳ سویه فاقد همولیز بودند. هیچ فاکتور منفرد غالب به عنوان پیشگویی کننده مهم حدت شناسایی نشده و به نظر می‌رسیدکه اثرات ژنها بیشتر به صورت تجمعی باشد (۲۰). نتایج این تحقیقات می‌تواند موید همین نکته باشد که اثرات تجمعی ژنها به مراتب بیشتر از تاثیر منفرد آنها است. در مطالعه Padmasini و همکاران از ۱۵۷ مورد انتروکوک جدا شده از بخش های بیمارستانی مختلف، ۷۳ مورد (۴۶/۵ ٪) انتروکوک فکالیس بودند. ژن cylA در ۲۳/۶ درصد از بیماران، gelE در ۵۱/۶ درصد، hyl در ۶/۴ درصد، asa1 در ۵۵/۴ درصد و esp در ۴۹/۷ درصد از نمونه ها جداسازی شد (۳۰) که از نظر میزان فراوانی برخی ژنها با نتایج تحقیقات ما همخوانی دارد.

می‌توان گفت که فراوانی کمتر ژن hyl منطقی بوده و مطابق با سایر نتایج می باشد. در مطالعه Vankerckhoven و همکاران در ۲۷۱ نمونه جدا شده از انتروکوک فکالیس، ۱۳۵ مورد از آنها مقاومت دارویی داشتند. فراوانی ژن esp در نمونه های مدفوعی ۷۳ ٪ و فراوانی ژن hyl در نمونه های مذکور تا ۲۹٪ محاسبه گردید(۲۷). در صورتی که در این مطالعه ژن hyl در هیچ یک از نمونه‌ها ردیابی نگردید و ژن esp در مجموع نمونه‌های جداشده از زنان و مردان با مطالعه فوق همخوانی دارد. مطالعه Worth و همکاران نشان داد که وجود ژن esp در ۸۱/۵ درصد از بیماران مثبت بود ولی ارتباطی بین میزان عوارض مشاهده شده در بیماران مذکور با حضور ژن مشاهده نگردید (۳۱). Biendo و همکاران در تحقیقات خود در سال ۲۰۱۰ به این نتیجه رسیدند که با کمک روش PCR ۲۹/۸ درصد از نمونه‌ها از نظر ژن hyl و ۷۰/۲ درصد به صورت همزمان از نظر ژنهای esp و hyl مثبت بودند (۲۱). در حالیکه در پژوهش اخیر این دو ژن به طور همزمان شناسایی نشده اند. با توجه به نقش پروتئین سطحی انتروکوک که توسط ژن esp کروموزومی رمزدهی می‌شود با افزایش بیماریزایی، کلونیزاسیون، پایداری در مجاری ادراری و تشکیل بیوفیلم همراه است و در اتصال اولیه و تشکیل بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس دخالت دارد که در کلونیزه شدن و بقای انتروکوکوس فکالیس در عفونت‌های مجاری ادراری در مدل‌های حیوانی نشان داده شده است (۳۲و۱۲و۹). پروتئین سطحی، در مقادیر بالا در ایزوله های مولد

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.9.3]
[DOI: 10.22088/jbums.18.3.62]

اندوکاردیت و باکتریمی مشاهده شده ولی به ندرت در ایزوله های مدفوعی افراد سالم مشاهده میگردد. در میان ژنهای مورد مطالعه تحقیق حاضر ژن esp در زنان با شیوع ۲۸٪ گزارش شد که با مطالب فوق و نقش این ژن در ایجاد عفونتهای ادراری به خصوص در زنان منطقی می‌باشد. در تحقیق حاضر فراوانی کلی این ژن در هردو جنس زن و مرد ۲۸/۳ ٪ گزارش شده که در بین ۶۰ نمونه، تعداد ۱۷ نمونه واجد این ژن بودند. در تحقیقات Hassani و همکاران از بین ۲۲۰ نمونه مورد بررسی، ۶۵/۹٪ از نظر gelE، ۴۹/۵ ٪ از نظر esp و asa1 در ۵۳/۶ ٪ از بیماران مثبت بودند (۴).

آنزیم ژلاتیناز، توسط ژن gelE کروموزومی رمزدهی می‌شود. این آنزیم یک متالوپروتئاز خارج سلولی است که کلاژن، ژلاتین و پپتیدهای کوچک را هیدرولیز نموده و در تشکیل اندوکاردیت مدلهای حیوانی نقش دارد. تشکیل بیوفیلم به سلولها اجازه میدهد در شرایط نامساعد زنده بمانند (۲۳و۱۹). با توجه به نقش این ژن در پایداری باکتری با تشکیل بیوفیلم، درصد فراوانی آن در تحقیق ما با بالاترین میزان نسبت به سایر ژنها، ۵۶/۶٪ ردیابی گردید. همچنین توزیع فراوانی آن در بین بیماران زن ۳۷/۷ ٪ شناسایی شد. تولید سیتولیزین به طور قابل توجهی شدت اندوکاردیت و اندوافتالمیت را در مدل حیوانی تشدید نموده و باعث شدت بیماری انتروکوکی در انسان می‌گردد (۳۳و۶).

تحقیقات اپیدمیولوژی نقش سیتولیزین را در وقوع بیماری را تایید می‌کند. Coque و همکاران هیچ اختلافی را در بروز ژن سیتولیزین در بین ایزوله‌های انتروکوکوس فکالیس جدا شده از نمونه‌های اندوکاردیت، باکتریمی و یا نمونه مدفوع افراد سالم مشاهده نکردند (۱۷). در مطالعه ای دیگر فقط ۱۶ درصد از ایزوله‌های انتروکوکوس فکالیس قادر به تولید سیتولیزین بوده و نقش این پروتئین به عنوان فاکتور مهم حدت ویرولانس مهم، در نظر گرفته شد (۲۹). با توجه به این نکته، فروانی پایین ژن سیتولیزین در تحقیق حاضر با ۱۱/۶ درصد در کل نمونه‌ها و میزان ۹/۴ درصد در زنان منطقی به نظر می‌رسد. ژن سیتولیزین خاموش در ایزوله های بالینی انتروکوکوس فکالیس ممکن است یک الگوی منفی فنوتیپی را نشان دهد، که با نتایج مطالعه ما همخوانی داشته و فاقد فعالیت همولیتیک بوده که از نظر ژنی نیز تایید گردید، ولی فاکتورهای محیطی نظیر آن چه که در محل عفونت رخ میدهد ممکن است باعث فعالیت ژنها گردد (۳۴). در این تحقیق مشخص شد که فراوانی انتروکوکوس فکالیس در جمعیت زنان بیشتر بوده که علت این امر ناشی از ساختار دستگاه ادراری و متعاقباً عفونت ادراری فراوانتر در زنان می‌باشد که موجب بروز ژنهای حدت با درصد فراوانی بیشتر می-گردد. همچنین مشخص گردید که بروز عفونت با تاثیر همزمان ژنهای حدت به مراتب بیشتر از اثر ژن حدت به تنهایی می‌باشد. علت بیماریزایی بالای انتروکوک فکالیس را با دو مسأله مهم می توان تفسیر نمود؛ نخست آن که میزان بقای این باکتری در محیط بالا بوده و می‌تواند میزبانهای متعددی را آلوده نماید و دوم آن که این باکتری دارای فاکتورهای تهاجمی(Virulence) بسیاری می باشد که از نسلی از باکتری به نسل بعد نیز از طریق ژنتیکی انتقال می یابند و می‌توانند با استفاده از روش‌هایی که قادر به شناسایی سویه‌های حاد و تشخیص گسترده آنها باشند در طراحی راهکارهای پیشگیری کننده و کنترل انتشار این سویه‌ها مهم می‌باشند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از زحمات پرسنل آزمایشگاه میکروبیولوژی پاسارگاد مهندس ابوالفضل مقدم و دکتر علیرضا مختاری، تقدیر و تشکر می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.9.3]
[DOI: 10.22088/jbums.18.3.62]

Evaluation of the Frequency of Virulence Genes in Enterococcus Faecalis Isolates from Fecal Samples by Multiplex PCR Method

F. Kazemeini (MSc)[1], K. Amini (PhD)*[1]

1.Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(3); Mar 2016; PP: 62-8

Received: Aug 31th 2015, Revised: Sep 28th 2015, Accepted: Feb 6th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Enterococcus faecalis, as the leading cause of hospital-acquired infections, contains virulence factors which are involved in bacterial colonization, immune system resistance, competition with other microorganisms, and damage to the host through the production of secretory factors. The aim of this study was to evaluate the frequency of virulence genes in Enterococcus faecalis isolates obtained from fecal samples by multiplex polymerase chain reaction (PCR) method.

METHODS: In this descriptive-analytical study, 200 fecal samples were collected from Kerman medical centers, and 60 Enterococcus faecalis isolates were identified by culturing in selective media (e.g., KF Streptococcus agar) and performing biochemical tests. Multiplex PCR method was used to identify virulence genes.

FINDINGS: Based on the findings, the frequency of Enterococcus faecalis infection was 52% and 48% among females and males, respectively; overall, the frequency of virulence genes was higher in females than males. Also, according to the results, asa1 (80.6%) and cylA (16.1%) genes had the highest and lowest frequencies, respectively, whereas hyl gene was not detectable in any of the samples.

CONCLUSION: As the findings revealed, the frequency of Enterococcus faecalis infection was higher in the female population. Considering the anatomy of female urinary tract and the subsequent recurrent infections in women, the frequency of virulence genes was higher in women.

KEY WORDS: *Enterococcus faecalis, Virulence genes, Polymerase chain reaction*.

Please cite this article as follows:

Kazemeini F, Amini K. Evaluation of the Frequency of Virulence Genes in Enterococcus Faecalis Isolates from Fecal Samples by Multiplex PCR Method. J Babol Univ Med Sci. 2015;18(3):62-8.

***Corresponding author: K. Amini (PhD)**

Address: Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, I.R.Iran

Tel: +98 86 42241511

E-mail: kamini@iau-saveh.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.9.3]

[DOI: 10.22088/jbums.18.3.62]

References

1. Dahlen G, Blomqvist S, Almståhl A, Carlén A. Virulence factors and antibiotic susceptibility in enterococci isolated from oral mucosal and deep infections. J Oral Microbiol .2012; 4: 10855.

2. Zou LK, Wang HN, Zeng B, Li JN, Li XT, Zhang AY, et al. Erythromycin resistance and virulence genes in Enterococcus faecalis from swine in China. New Microbiolo. 2011; 34(1): 73-80.

3.Zhanel GG, DeCorby M, Laing N, Weshnoweski B, Vashisht R, Tailor F, et al. Antimicrobial-resistant pathogens in intensive care units in Canada: results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) study, 2005-2006. Antimicrob Agents chemother. 2008;52(4): 1430-7.

4. Hasani A, Sharifi Y, Ghotaslou R, Naghili B, Hasani A, Aghazadeh M, et al. Molecular screening of virulence genes in high-level gentamicin-resistant Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium isolated from clinical specimens in Northwest Iran. Indian J Medi Microbiol.2012; 30(2): 175-181.

5. Arias CA, Murray BE. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. Nat Rev Microbiol. 2012; 10(4):266-78.

6. Coburn PS, Gilmore MS. The Enterococcus faecalis cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. Cell Microbiol. 2003; 5(10): 661-9.

7. Nakayama J, Cao Y, Horii T, Sakuda S, Akkermans AD, de Vos WM, et al. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in Enterococcus faecalis. Mol Microbiol. 2001;41(1):145-54.

8. Rice LB, Carias L, Rudin S, Vael C, Goossens H, Konstabel C, et al. A potential virulence gene, hylEfm, predominates in Enterococcus faecium of clinical origin. J Infect Dis.2003;187(3): 508-12.

9. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N, et al. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by Enterococcus faecalis. Infect Immun.2004;72(10): 6032-9.

10. Nallapareddy SR, Wenxiang H, Weinstock GM, Murray BE. Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic resistance-receptive Enterococcus faecalis lineage and dissemination of its putative pathogenicity island. J Bacteriol.2005;187(16):5709-18.

11. Mundy L, Sahm D, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev.2000;13(4): 513-22.

12. Shankar N, Lockatell C., Baghdayan S., Drachenberg C. Gilmore M, Johnson E.. Role of Enterococcus faecalis surface protein ESP in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. Infect Immun. 2001;69(7): 4366-72.

13. Shepard BD, Gilmore MS. Differential expression of virulence-related genes inEnterococcus faecalis in response to biological cues in serum and urine. Infect Immun .2002;70(8): 4344-52.

14. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP., Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. Infect Control Hosp Epidemiol.2000;21(8): 510-5.

15. Kühn I, Iversen A, Finn M, Greko C, Burman LG, Blanch AR., et al., Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions. Appl Environ Microbiol.2005;71(9): 5383-90.

16. Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB., et al., Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic Enterococcus spp. Oral Microbiol Immunol. 2005;20(1): 10-9.

17. Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. J Infect Dis.1995; 171(5): 1223-9.

18. Solheim, M., Aakra A , Snipen L, Brede D , Nes L. Comparative genomics of Enterococcus faecalis from healthy Norwegian infants. BMC genomics.2009;10(1): 194.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.9.3]
[DOI: 10.22088/jbums.18.3.62]

19. Eaton, T.J,. Gasson M.J.molecular screening of enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Appl Environ Microbiol. 2001; 67(4): 1628-35.

20. Ghasemi A MR, Khorshidi A, Musavi G. The survey of virulence factors of Enterococcusfaecalis isolated from urine samples. Iran J Med Microbiol. 2009; 2(3-4): 53-8. [in Persian]

21. Biendo M, Adjidé C., Castelain S., M. Belmekki, Rousseau F., . Slama M, et al. Molecular characterization of glycopeptide-resistant enterococci from hospitals of thepicardy region (france). Int J Microbiol 2010; 2010: (150464):1-8.

22. Chow J W, Thal L A, Perri M B, Vazquez J A, Donabedian S M, Clewell D B, et al., Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. Antimicrob agents chemother, 1993. 37(11): 2474-77.

23.Elsner H. A, Sobottka I., Mack D., Claussen M., Laufs R., Wirth R. Virulence factors of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium blood culture isolates. Eur J ClinMicrobiol Infect Dis.2000; 19(1): 39-42.

24. Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. Aggregation substance of enterococcus faecalis mediates adhesion to cultured renal tubular cells. Infect Immun.1992; 60(1): 25-30.

25. Amir Mozafari N, Alebouyeh M, Forouhesh H. Conjugational plasmid transmissibility of virulence-related and antibiotic resistance genes among enterococcal isolates. Razi J Med Sci. 2006. 13(50): 17-26. [In Persian]

26. Hardie KR, Badwin T, William P, Borriello SP, Murray PR, Funke G. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial infections. 10th ed. Edward Arnold; 2005. p.867-82.

27.Vankerckhoven V, Autgaerden TV, Vael C, Lammens Ch, Chapelle S, Rossi R, et al. Development of a multiplex PCR for the detection of asa1, gelE, cylA, esp, and hyl genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of Enterococcus faecium. J Clin Microbiol.2004; 42(10): 4473-9.

28. Klare I, Konstabel C, Mueller-Bertling S, Werner G, Strommenger B, Kettlitz C, et al. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant Enterococcus faecium of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes esp and hyl in German hospitals. Eur J Clin Microbiol Infect.2005; 24(12):815-25.

29. Haas W, Shepard BD, Gilmore MS. Two-component regulator of Enterococcus faecalis cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. Nature.2002; 415(6867): 84-7.

30.Padmasini E, Divya G, Karkuzhali M, Padmaraj R, Srivani R. Distribution of cylA, esp, asa1, hyl and gelE virulence genes among clinical isolates of Enterococcus faecium and Entrococcus faecalis. BMC Infect Dis. 2014;14(3): 32.

31. Worth LJ, Slavin MA, Vankerckhoven V, Goossens H, Grabsch EA, Thursky KA.. Virulence determinants in vancomycin-resistant Enterococcusfaecium vanB: clonal distribution, prevalence and significance of esp and hyl in Australian patients with haematological disorders. J Hosp Infect.2008; 68(2): 137-44.

32. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta M, Cucarella C, Lamata M, et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in Enterococcus faecalis biofilm formation. Appl Environ Microbiol.2001;67(10): 4538-45.

33. Archimbaud C, Shankar N, Forestier C, Baghdayan A, Gilmore MS, Charbonné F, et al. In vitro adhesive properties and virulence factors of Enterococcus faecalis strains. Res microbiol. 2002;153(2):75-80.

34.Emaneini M, Aligholi M, Aminshahi M. Characterization of glycopeptides ,aminoglycosides and macrolide resistance among Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium isolates from hospitals in Tehran. Pol J Microbiol.2008; 57(2): 173-8.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.9.3]
[DOI: 10.22088/jbums.18.3.62]