Arak Medical University Journal (AMUJ)
2012; 15(62): 39-48

Original Article

The evaluation of *esp* and *eep* genes in *Enterococcus* strains isolated from clinical urine samples in Tehran

Salehi M(PhD)[1]*, Mosavari N(PhD)[2], Hosseini F(PhD)[1], Mobaraki M(M.Sc)[1]

1- Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

Received: 10 Jul 2011, Accepted: 27 Sep 2011

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 2:15 +0430 on Thursday July 19th 2018

Abstract

Background: Numerous factors, such as *Enterococcus* antimicrobial resistance and expression of virulence factors, may account for the maintenance and prevalence of Enterococci infection. The aim of the present study was to assess the occurrence of *esp* and *eep* genes in the *E.faecalis* and *E.facium* strains isolated from the patients with urethral system infections.

Materials and Methods: In this experimental study, 214 clinical samples, including 80 catheters and 134 urine samples, were collected from the patients. The identification of the isolated samples was based on the growth on Bilesculin agar culture media, tolerance of 6.5% Nacl, gram staining, and catalase, hydrolysis of hyporate, telorite reduction, arginine hydrolization, and fermentation of the carbohydrates tests. The assessment of genes was done by PCR method.

Results: esp gene was present in 83% of the urine samples and in 97% of the catheters while eep gene was present in 100% of the urine samples and 90% of the urine catheters. The results of antibiogram indicated that the multi-antibiotic resistance was about 78.1% against vancomycin and tetracyclin, 75% against cyprofeloxin and tetracyclin, 59.3% against vancomycin and cyprofeloxin, and about 53% against vancomycin and streptomycin.

Conclusion: The findings of this study indicate that esp gene plays an important role in formation of biofilm in patients. Due to the presence of *eep* gene in almost all of the samples, it can used as a rapid identical agent for the assessment of pheromone production and provision of suitable conditions for plasmid transformation between clinical strains and the prevalence of antibiotic resistance.

Keywords: Antibiogram, biofilm, PCR

*Corresponding author:
Address: Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Email: Mitra_Salehi_Microbiology@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 2:15 +0430 on Thursday July 19th 2018

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 15، شماره3 (شماره پیاپی 62)، مرداد 1391،48-39

ارزیابی ژن‌های *esp* و *eep* در سویه‌های انتروکوک جدا شده از نمونه‌های بالینی ادراری شهر تهران

میترا صالحی[1*]، نادر مصوری[2]، فرزانه حسینی[1]، مرضیه مبارکی [3]

1- استاد یار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

2- استاد یار، موسسه سرم سازی و واکسن سازی رازی، کرج، ایران

3- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 90/4/20 تاریخ پذیرش: 90/7/6

چکیده

زمینه و هدف: عوامل مختلف از جمله مقاومت آنتی بیوتیکی انتروکوک‌ها و بیان ژن‌های دخیل در بیماری‌زایی، در پایداری این باکتری در شرایط مختلف و گسترش عفونت دخالت دارند. هدف از این مطالعه بررسی میزان حضور ژن‌های *esp* و *eep* در سویه‌های انتروکوک فکالبس و فاسیوم جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های دستگاه ادراری بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، تعداد 214 نمونه کلینیکی، شامل 80 نمونه کاتتر ادراری و 134 نمونه ادرار از بیماران جمع‌آوری شد. تعیین هویت سویه‌های جدا شده بر اساس رشد در محیط بایل اسکولین آگار، تحمل نمک 6/5 درصد، رنگ آمیزی گرم، آزمون‌های کاتالاز، هیدرولیز هیپورات، احیای تلوریت، هیدرولیز اسید آمینه آرژینین و تخمیر قندها مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی ژن‌ها با روش PCR انجام شد.

یافته‌ها: ژن *esp* در 83 درصد از نمونه‌های ادرار و 97 درصد کاتترهای ادراری و ژن *eep* در 100 درصد نمونه‌های ادرار و 90 درصد از کاتترهای ادراری حضور داشتند. میزان مقاومت چند دارویی سویه‌های انتروکوکی نسبت به جنتامایسین و تتراسایکلین 78/1 درصد، سفالسپورین و تتراسایکلین 75 درصد، جنتامایسین و سفالسپورین 59/3 درصد و جنتامایسین و استرپتومایسین 53 درصد بر آورد شد.

نتیجه‌گیری: نتایج می‌توانند نشان‌گر اهمیت نقش ژن *esp* در تشکیل بیوفیلم در بیماران باشند. با توجه به حضور ژن *eep* در اغلب نمونه‌ها می‌توان از آن به عنوان ابزار تشخیصی سریع به منظور ارزیابی تولید فرومون و فراهم نمودن شرایط لازم جهت انتقال پلاسمیدها بین سویه‌های کلینیکی و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشد.

واژگان کلیدی: آنتی بیوگرام، بیوفیلم، PCR

***نویسنده مسئول:** تهران، خیابان ولیعصر، کوچه سالار، مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

Email: Mitra_Salehi_Microbiology@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 2:15 +0430 on Thursday July 19th 2018

مقدمه

انتروکوکوس‌ها در زیست‌گاه‌های طبیعی مختلف مانند خاک، آب و دستگاه گوارش حیوانات یافت می‌شود(1). مطالعات فراوانی خاطر نشان کرده‌اند که برخی از گونه‌های این باکتری می‌توانند یک نقش دو گانه در اکولوژی انسانی بازی کنند، به طوری که در طی چند سال اخیر افزایش قابل توجهی در میزان شیوع عفونت‌های انتروکوکی در سطح جهان مشاهده می‌شود.

گونه‌های انتروکوکوس فکالیس حدود80 تا 90 درصد و انتروکوکوس فاسیوم حدود 10 درصد از کل عفونت‌های انسانی ناشی از این جنس را به خود اختصاص می‌دهند(2). این باکتری گرم مثبت فرصت طلب، با قابلیت رشد در محیط‌های دارای غلظت بالای نمک، گستره وسیعی از pH، توانایی اکتساب مقاومت‌های دارویی و گسترش در بین بیماران را دارد(3). امروزه مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه انتروکوک‌ها (Multidrug resistance-MDR) به لحاظ بالینی حائز اهمیت می‌باشد(4). بیماری‌هایی مهم انتروکوکی در انسان اغلب شامل عفونت‌های سیستم ادراری، شکمی و لگنی، سپتی سمی، زخم، اندوکاردیت، مننژیت و عفونت‌های نئوناتال و عفونت‌های وابسته به کاتتر می‌باشند(5). این امر انتروکوک‌ها را به عنوان یک عامل مهم در عفونت‌های بیمارستانی مطرح می‌کند به گونه‌ای که در تعدادی از گزارشات، این باکتری را دومین عامل مهم عفونت‌های دستگاه ادراری-تناسلی و هم چنین سومین علت رایج عفونت‌های بیمارستانی مطرح می‌کنند(6، 7).

رشد باکتری‌های سطحی در هر محیطی که از لحاظ طبیعی، صنعتی و اکوسیستم مناسب باشد منجر به تشکیل بیوفیلم می‌شود(4). اکنون مشخص شده که بیوفیلم میکروبی توده‌ای از باکتری است که در ابتدا با نیروی واندروالسی به طور ضعیفی به سطوح بی جان یا بافت زنده متصل می‌شوند و در مرحله بعدی با تولید پلی‌مرهای خارج سلولی و ایجاد ساختار ماتریکس آلژینات، موجب اتصال غیر قابل برگشت سلول‌ها به سطوح می‌شوند(8)، به طوری که در محیط‌های بیمارستانی بیوفیلم میکروبی روی سطوح مختلف به عنوان یک مخزن انتقال عفونت مطرح می‌شود و آنها را مسئول ایجاد 65 درصد عفونت‌های بیمارستانی ذکر می‌کنند(9، 10). دما، غلظت داروهای ضد میکروبی، ترکیبات غذایی و هم‌چنین عوامل ژنتیکی از عوامل مهم در تولید و گسترش بیوفیلم میکروبی به شمار می‌روند(6-11). توسعه بیوفیلم باعث مقاومت باکتری نسبت به درمان‌های آنتی بیوتیکی شده(3-10) و می‌تواند منجر به بروز مشکلات حاد در این زمینه شود. باکتری‌های شرکت کننده در بیوفیلم، رفتاری متفاوت نسبت به سلول‌های آزاد (پلانکتونیک) دارند(12، 13). یک بیوفیلم بالغ می‌تواند غلظت‌های آنتی‌بیوتیک را 10 تا 100 برابر بیشتر از غلظت لازم برای کشتن باکتری‌های پلانکتونیک تحمل کند(14).

انتروکوک‌ها به عنوان یکی از باکتری‌های شاخص در عفونت‌های مجاری ادراری با مقاومت بالای آنتی بیوتیکی و توانایی تولید بیوفیلم گزارش شده‌اند(9، 15، 16). چسبندگی و تولید بیوفیلم توسط گونه‌های فکالیس و فاسیوم در مواد پزشکی مانند محلول‌های شستشوی لنزهای چشمی، ابزار پزشکی مختلف از قبیل کاتترهای درون وریدی، کاتترهای ادراری و در کانال‌های ریشه دندان مشاهده شده است.

دلیل اهمیت این باکتری در تشکیل بیوفیلم و عدم پاسخگویی به درمان این است که به آسانی نمی‌توان عناصر کروموزومی را که ویژگی‌های آنان را مشخص می‌کنند، تغییر داد(14). از این رو اتصال مؤثر انتروکوک‌ها بر سطوح مختلف یکی از عوامل مهم پاتوژنز عفونت‌های انتروکوکی به شمار می‌آید و توانایی انتروکوک برای تشکیل بیوفیلم نگرانی بزرگی برای سلامت عمومی نه فقط در بیماری‌هایی عفونی بلکه از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارد.

امروزه محققان به بررسی ژن‌های مؤثر در تشکیل بیوفیلم در سویه‌های انتروکوک با منشاء مختلف می‌پردازند. ژن پروتئین سطحی انتروکوکی (enterococcal surface protein-esp) توانایی کلونیزاسیون و ایجاد بیوفیلم باکتریایی در محیط آزمایشگاهی (in vitro) را افزایش می‌دهد و به نظر می‌رسد که با حضور بیوفیلم در بدن

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 2:15 +0430 on Thursday July 19th 2018

جاندار(in-vivo) نیز مرتبط می‌باشد(1، 17، 18). جهت انتقال پلاسمیدهای موجود در جنس انتروکوک، باکتری دهنده به گیرنده فرومون‌ها لازم هستند. ژن *eep* (enhanced expression of pheromone) کد کننده چندین فرومون مختلف می‌باشند. در حقیقت ژن *eep* یک پروتئاز غشایی می‌باشد که در فرایند پس از ترجمه توالی ابتدایی پپتیدی به پپتیدهای فرومونی بالغ مختلف نقش دارد(19). هدف از این مطالعه بررسی میزان حضور ژن‌های *esp* و *eep* در سویه‌های انتروکوک فکالیس و فاسیوم جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های دستگاه ادراری می‌باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی تعداد 214 نمونه، شامل 80 نمونه کاتتر ادراری و 134 نمونه ادرار از بیمارانی که طی مدت یک سال به مراکز بهداشتی درمانی واقع در مناطق مختلف شهر تهران مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری شد. کاتترهای ادراری بلافاصله در محیط نگهدارنده تایوگلیکولات (شرکت مرک) به آزمایشگاه انتقال داده شدند. جداسازی باکتری‌های شرکت کننده در بیوفیلم کاتتر ادراری به روش سرکا انجام گرفت(20). برای این منظور هر کاتتر از قسمت میانی برش داده و چهار تا پنج مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل کاملا شستشو داده شد تا سلول‌های پلانکتونی آن حذف شود. سپس با اسکالپل استریل، سطح داخلی کاتتر را تراشیده و درون لوله حاوی آب مقطر استریل قرار داده شد. جهت کنده شدن باکتری‌ها از سطح کاتتر، لوله‌ها به مدت 5 دقیقه ورتکس و با دور 4000 rpm سانتریفیوژ شدند. در نهایت یک لوپ از رسوب حاصله برداشته و بر روی محیط بایل اسکولین آگار کشت (مرک) و در دمای 45 درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شد.

از نمونه‌های ادرار نیز بعد از انتقال به آزمایشگاه، در شرایط استریل بر روی محیط بایل اسکولین آگار کشت داده شد. به منظور تایید کلنی‌های مشکوک به انتروکوک، از کلنی‌های تشکیل شده بر روی محیط بایل اسکولین، کشت خالص تهیه شد و مورد مطالعه میکروسکوپی و ماکروسکوپی قرار گرفتند. با استفاده از روش رنگ آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی کاتالاز، هیدرولیز هیپورات، تحمل نمک 6/5 درصد، رشد در دمای 45 درجه سانتی‌گراد، احیای تلوریت، هیدرولیز اسید آمینه آرژینین و تخمیر قندهای آرابینوز، مانیتول، سوربیتول، لاکتوز و سوربوز، سویه‌های جدا شده تعیین هویت شدند(11-2).

دیسک‌های آنتی بیوتیک (پادتن طب) برای تعیین حساسیت سویه‌های انتروکوک شامل وانکومایسین (30 میکروگرم)، جنتامیسین (10 میکروگرم)، استرپتومایسین (10 میکروگرم)، کلرامفنیکل (30 میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (5 میکروگرم)، تتراساکلین (30 میکروگرم)، کانامایسین (30 میکروگرم)، ریفامپین (5 میکروگرم)، اریترومایسین(10 میکروگرم)، آمپی سیلین (25 میکروگرم) و سفالکسین (30 میکروگرم) بودند. بررسی مقاومت دارویی (آنتی بیوگرام) به روش انتشار در آگار (Kirby) و طبق استاندارد NCCLS انجام پذیرفت(21).

برای این منظور سوسپانسیون میکروبی از باکتری‌های 16 ساعته در فاز رشد، برابر با کدورت استاندارد 0/5 مک فارلند (غلظت تقریبی CFU/ml $1/5\times10^8$) تهیه و توسط سوآب بر روی محیط مولر هینتون آگار به صورت متراکم کشت داده شد. سپس در شرایط استریل، دیسک گذاری انجام پذیرفت. میزان قطر هاله عدم رشد بعد از 24 ساعت گرما گذاری در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، با کولیس اندازه‌گیری و در نهایت الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌ها بر اساس در صد گزارش گردید.

در این پژوهش سویه‌های انتروکوک با مقاومت چند گانه، جهت بررسی ملکولی و تولید بیوفیلم انتخاب شدند. تشکیل بیوفیلم در میکروپلیت‌های پلی استیرنی انجام شد. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، 20 میکرولیتر از سلول‌های باکتری شسته شده به 180 میکرولیتر محیط کشت لوریا برتانی براث(Luria–Bertani) افزوده شد. بعد از تلقیح، سطح میکروپلیت‌ها پوشانده شد و یک سری از پلیت‌ها به مدت 24 ساعت و سری دیگر به مدت 48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شدند. بعد از

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 2:15 +0430 on Thursday July 19th 2018

اتمام مدت گرماگذاری، محتوای چاهک‌ها کاملا تخلیه شد. هر چاهک میکروپلیت سه مرتبه با سرم فیزیولوژی شستشو و تکان داده شد تا هرگونه فرم شناور باکتری که در بیوفیلم شرکت نکرده بود، حذف گردد. بیوفیلم‌های تشکیل شده با 200 میکرولیتر فرمالید 12 درصد به مدت نیم ساعت تثبیت و با کریستال ویوله رنگ آمیزی و در نهایت در طول موج 492 نانومتر توسط دستگاه الایزا (بیوتک BioTek) خوانده شدند(11).

جهت استخراج DNA باکتریایی چند کلنی از هر سویه انتروکوک، در 4 میلی لیتر محیط LB کشت داده شد. پس از طی مدت زمان گرماگذاری (16-20 ساعت) که باکتری‌ها به کدورت لازم و فاز لگاریتمی رشد رسیدند، محتویات لوله‌ها سانتریفوژ شدند. از رسوب باکتریایی حاصل، جهت استخراج DNA ژنومی توسط کیت تخلیص شرکت متابیون (metabion) مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام عملیات PCR ، ابتدا هر نمونه DNA استخراج شده توسط الکتروفورز و اسپکتروفتومتر مورد ارزیابی کیفی و کمی قرار گرفت.

به منظور بررسی ملکولی نمونه‌های کلینیکی مبنی بر حضور ژن‌های *eep* و *esp*، از پرایمرهای طراحی شده در جدول 1 استفاده شد.

جدول 1. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	پرایمر	اندازه باند (جفت باز)	توالی
esp	esp12- esp11	933	F: TTG CTA ATG CTA GTC CAC GAC C R: GCG TCA ACA CTT GCA TTG CCG AA
eep	eepR1-eepF1	937	F: GAG CGG GTA TTT TAG TTC GT R: TAC TCC AGC ATT GGA TGC T

حجم نهایی واکنش برای هر دو ژن یکسان (25 مایکرولیتر) در نظر گرفته شد، اما برنامه زمان‌بندی برای هر واکنش به صورت متفاوت و مجزا انجام گرفت. مرحله واسرشت اولیه در 94 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و سپس تکثیر در 30 سیکل به ترتیب زیر بود.

برای تکثیر قطعه ژنی *eep*، واسرشت سازی در 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه، اتصال پرایمرها در 54 درجه سانتی‌گراد به مدت 60 ثانیه و باز آرایی نوکلئوتیدها در دمای 72 درجه سانتی‌گراد برای 60 ثانیه انجام شد.

به منظور تکثیر ژن *esp*، مرحله واسرشت سازی در 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها در 60 درجه سانتی‌گراد به مدت 60 ثانیه و مرحله طویل شدن در دمای 72 درجه سانتی‌گراد برای 60 ثانیه به اجرا در آمد.

مراحل PCR با بازآرایی نهایی در دمای 72 درجه به مدت 5 دقیقه پایان پذیرفت و محصول PCR در دمای 4 درجه سانتی‌گراد تا انجام مرحله بعد نگهداری شد.

غلظت مواد لازم برای انجام واکنش PCR شامل 0/2 پیکومول از هر پرایمر به ازای هر میکرولیتر، 10 میلی مولار dNTP و 100 میلی مولار کلرید منیزیم بود.

یافته ها

در این مطالعه از 214 نمونه بالینی جمع‌آوری شده، 55 سویه (25/7 درصد) متعلق به جنس انتروکوکوس انتخاب شدند.

نتایج تعیین هویت نهایی سویه‌های انتروکوک و تمایز بین گونه‌های فکالیس و فاسیوم بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی از جمله تخمیر قندها، تولید آمونیاک از آرژنین، رشد در محیط 0/1 درصد متیلن بلو حاکی از حضور 46 عدد انتروکوک فکالیس (83/63 درصد) و 9 عدد انتروکوک فاسیوم (16/36 درصد) بود.

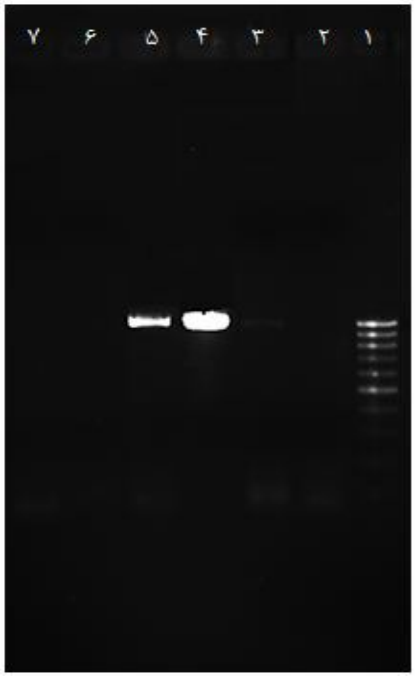
نتایج حاصل از آنتی بیوگرام نشان داد که میزان مقاومت چندگانه نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج درمان به ترتیب شامل آنتی بیوتیک‌های وانکومایسین و تتراسایکلین (78/1 درصد)، سیپروفلوکسین و تتراسایکلین(75 درصد)، ونکومایسین و سیپروفلوکسین (59/3 درصد) و ونکومایسین و استرپتومایسین(53/1 درصد) بود.

نتایج حاصل از بررسی مولکولی نشان داد که از مجموع 36 سویه انتروکوکی جدا شده از نمونه ادرار، 83 درصد آنها از نظر حضور ژن*esp* و100 درصد برای ژن *eep* مثبت بودند. هم‌چنین در 97 درصد از کل سویه‌های

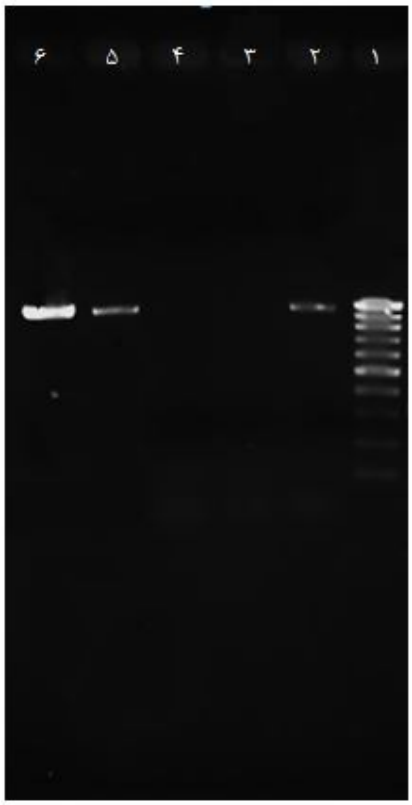
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 2:15 +0430 on Thursday July 19th 2018

جدا شده از کاتترهای ادراری تکثیر باند 933 bp مرتبط به ژن*esp* و در 90 درصد سویه‌ها باند 937 bp ژن *eep* مشاهده شد(شکل 1 و 2).

مقایسه میانگین نتایج جذب نوری (OD492) چاهک‌های تیمار شده با سویه‌های انتروکوک جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری نشان داد که میزان تشکیل بیوفیلم در سویه‌های حاوی ژن *esp* (0/728) نسبت به سویه‌های فاقد این ژن (0/269) بیشتر بوده و با طولانی شده زمان انکوباسیون میزان بیوفیلم نیز افزایش می‌یابد.



شکل 1. الکتروفورز محصول PCR حاصل از بررسی ژن esp. ستون 1-مارکر وزن مولکولی bp100، ستون 4-نمونه ادراری مثبت، ستون 5- نمونه کاتتر ادراری مثبت، ستون های 6و7- نمونه کاتتر و ادراری منفی



شکل 2. الکتروفورز محصول PCR حاصل از بررسی ژن *eep*. ستون 1-مارکر وزن مولکولی bp100، ستون 2و5-نمونه ادراری مثبت، ستون 6 – نمونه کاتتر ادراری مثبت، ستون3 – نمونه کاتتر ادراری منفی

بحث

شناسایی گونه‌های انتروکوک فکالیس و فاسیوم در میان ایزوله‌های بالینی، نشان داد که میزان آلودگی عفونت‌های دستگاه ادراری اعم از ادرار و کاتتر، با گونه انتروکوک فکالیس (83/63 درصد) نسبت به انتروکوک فاسیوم (16/36 درصد) بیشتر است. انتروکوک‌ها از جمله پاتوژن‌های فرصت طلبی هستند که به عنوان یکی از مهم‌ترین باکتری‌های مسئول عفونت‌های بیمارستانی مطرح می‌باشند(22-6) و در اغلب مطالعات انجام گرفته در سایر نقاط جهان نیز همواره انتروکوک فکالیس بالاترین شیوع را در عفونت‌های بالینی به خصوص در سیستم ادراری داشته است(23).

از سوی دیگر با توجه به نتایج این تحقیق مبنی بر حضور بیشتر سویه‌های انتروکوک در بیماران دارای

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 2:15 +0430 on Thursday July 19th 2018

کاتترهای ادراری نسبت به بیماران با عفونت‌های ساده ادراری، به نظر می‌رسد که مقادیر قابل توجه انتروکوک جدا شده از کاتترهای ادراری می‌تواند حاکی از ماندگاری این باکتری در محیط مناسب کاتتر و هم‌چنین شرکت آن در بیوفیلم باشد. در نتیجه این باکتری می‌تواند یکی از شایع‌ترین میکروارگانیسم‌های تشکیل دهنده بیوفیلم میکروبی بر روی این گونه سطوح در بیماران باشد. البته در اثر آلودگی ثانویه در مراحل مختلف سوندگذاری از جمله محیط، ابزار و وسایل می‌تواند قابلیت انتقال در بین بیماران و در محیط‌های بیمارستانی را نیز پیدا کند. نتایج فوق با نتایج دیگر محققان هماهنگی دارد(26-24).

در مجموع میزان مقاومت بالایی حاصل از آنتی بیوگرام سویه‌های انتروکوک جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری مشاهده گردید. این مقاومت در بین ایزوله‌های جدا شده از کاتترهای ادراری بیشتر بود. در این مطالعه بیشترین مقاومت چند گانه نسبت به آنتی بیوتیک‌های وانکومایسین و تتراسایکلین مشاهده شد. عفونت دستگاه ادراری از متداول‌ترین عفونت‌هایی است که در بیماران سرپایی یا بستری شده در مراکز درمانی مشاهده می‌شود.

در بررسی آل یاسین و همکاران بر روی 126 نمونه بالینی مختلف از جمله ادرار، خون و کاتتر که در سال‌های 2004 تا 2005 از بیمارستان بقیه ا... تهران جمع‌آوری شده بود، بیشترین مقاومت به ترتیب در وانکومایسین (100 درصد) و تتراسایکلین (58 درصد) گزارش شد(27). محققان یکی از دلایل عمده افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی را قابلیت انتقال از طریق کانجوکیشن بیان می‌کنند، از طرفی شرایط بیوفیلم باکتری‌ها می‌تواند در این امر دخیل باشد(28). توانایی این باکتری در ایجاد بیماری ثابت شده و به نظر می‌رسد که افزایش و گسترش عفونت‌های انتروکوکی علاوه بر مقاومت‌های ذاتی و اکتسابی میکروارگانیسم نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، بستگی به توانایی آنها در تولید بیو فیلم بر روی سطوح غیر زیستی نیز دارد(29-9). در تحقیق حاضر نیز میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های انتروکوک را می‌توان به مصرف بی رویه دارو و هم‌چنین به گذشت زمان و احتمال انتقال فاکتورهای مقاومت بین باکتری‌ها به خصوص سلول‌های شرکت کننده در بیوفیلم نسبت داد.

نتایج حاصل از بررسی ملکولی برخی از عناصر ژنتیکی نشان داد که ژن‌های *esp* ، *eep* در اغلب ایزوله‌های انتروکوک برگرفته شده از نمونه‌های بالینی مورد بررسی، یافت می‌شوند. در مطالعه بیتنکورت و همکاران در سال 2004 در کشور برزیل بر روی انتروکوک‌های ایزوله شده، میزان حضور ژن *esp* در50 نمونه ادراری را 62 درصد و در مورد ژن *eep* را 58 درصد گزارش نمودند(30). در پژوهش حاضر این مقادیر با افزایش قابل توجه‌ای مشاهده شد، به طوری که تجمع کلنی‌های حاوی ژن *esp* در میان کاتترهای ادراری (97 درصد) نسبت به ادرار (83 درصد) شایع‌تر بود. ژن *esp* عامل پروتئین سطحی، دارای ساختار منحصر به فردی است که سهم بالایی در تولید آلژینات داشته و در نهایت می‌تواند ماندگاری انتروکوک‌های فکالیس و فاسیوم را افزایش دهد(31، 32). بنابر این فراوانی ژن *esp* در انتروکوک‌های شرکت کننده در بیوفیلم کاتتر بیماران، می‌تواند حاکی از ارتباط نقش پروتئین سطحی در شکل‌گیری بیوفیلم و تاثیر آن در واگیری بیماری‌هایی عفونی باشد(33-17).

مطالعه نمونه‌های بالینی مختلف در کشور برزیل نشان داد که بیش از نیمی از این سویه‌ها، مارکرهای ژنتیکی *eep* را بیان می‌کنند(30). در مطالعه حاضر مقادیر حضور ژن *eep* در نمونه‌های بالینی مورد بررسی، بیشتر از 90 درصد برآورد شد. در جنس انتروکوک پلاسمیدهای حامل ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها و عامل بیماری‌زایی می‌توانند در سطح بالایی توسط عمل کونژوگاسیون به باکتری‌های دیگر منتقل شوند. انتقال برخی از این پلاسمیدها در طی عمل کونژوگاسیون از باکتری دهنده به گیرنده توسط پپتیدهای نشانه به نام فرومون‌ها القا می‌شود. ان و همکاران ژن‌های*eep* کروموزومی را معرفی کرده‌اند که برای تولید طبیعی چندین فرومون مختلف لازم است. اطلاعات در دسترس از ساختار ژنتیکی *eep* نشان می‌دهد

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 2:15 +0430 on Thursday July 19th 2018

که این ژن می‌تواند یک پروتئاز غشایی باشد که در فرایند پس از ترجمه توالی پپتیدی ابتدایی به پپتیدهای فرومونی بالغ مختلف نقش دارد(19).

طبق گزارشات منتشر شده، میزان حضور و انتشار عوامل ویرولانس در سویه‌های ایزوله شده از عفونت‌های ادراری نسبت به سایر منابع کلینیکی، شایع‌تر است(30). مجموع مشاهدات حاصل نشان می‌دهد که حضور ژن های *eep* و *esp* در بین سویه‌های انتروکوک جدا شده از نمونه‌های ادرار و کاتتر با مقاومت بالای آنتی بیوتیکی، می‌توانند با کلونیزاسیون بیشتر باکتری و توسعه عفونت ادراری مرتبط باشد. در حقیقت عفونت فضای مناسبی را برای رشد و نموایجاد می‌کند که می‌تواند عامل نیرومندی در واگیری بیماری‌هایی عفونی و ایجاد اختلال در سیستم ایمنی بدن میزبان باشد.

در سال‌های اخیر عوامل ویرولانس متعددی در سویه‌های انتروکوک به عنوان شاخصه‌های شیوع بالای کلنی‌های مقاوم، جهت نقش آنها در انتقال و ماندگاری عفونت باکتریایی بین بیماران بیمارستانی مورد بررسی قرار گرفته است(31).

نتیجه گیری

هر چند برخی از مکانیسم‌های بیماری‌زایی عوامل ویرولانس مختلف شناخته شده اما در مورد انتروکوک‌ها به ویژه انتروکوکوس فکالیس هنوز کاملاً مشخص نشده و علت اصلی حضور این ژن‌ها در سویه‌های بالینی مختلف هنوز مبهم است. ولی مطالعات آینده در جهت شناسایی و فاش کردن نقش اصلی ژن‌های بیماریزایی در ویرولانس انتروکوک‌ها پیش می‌رود. از طرفی نتایج مطالعات در کشور برزیل و در تحقیق ما نشان می‌دهد که سویه انتروکوک فکالیس بیشتر از انتروکوک فاسیوم می‌تواند در تولید عفونت‌های ادراری و کلونیزاسیون و تشکیل بیوفیلم و رشد در کاتترهای ادراری نقش داشته باشد و گونه‌های انتروکوک مقاوم در برابر آنتی بیوتیک می‌توانند در شرایط خاص زیاد شوند. از این رو تعیین هویت ملکولی سویه‌های انتروکوک مسئول عفونت‌های ادراری و مستعد تشکیل بیوفیلم در بیماران، می‌تواند گام موثری جهت کنترل بیشتر عفونت‌های بیمارستانی باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاران گرامی سرکار خانم مهندس رویا رضوی پور و آقایان مهدی تندر و پیام موسوی که در تامین امکانات لازم جهت انجام پروژه ما را یاری نمودند سپاسگزاری می‌نماییم.

منابع

1. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in Enterococcus faecalis biofilm formation. Applied and environmental microbiology. 2001; 67(10):4538-45.
2. Manero A, Blanch AR. Identification of Enterococcus spp. with a biochemical key. Applied and environmental microbiology. 1999; 65(10): 4425-30.
3. Gristina AG, Hobgood CD, Webb LX, Myrvik QN. Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance. Biomaterials. 1987;8(6):423-6.
4. van Merode AEJ, van der Mei HC, Busscher HJ, Krom BP. Influence of culture heterogeneity in cell surface charge on adhesion and biofilm formation by Enterococcus faecalis. Journal of bacteriology. 2006;188(7):2421-6.
5. Yalda A, Rasuli M. [Tips on resistance of microbes against antimicrobial drug]. Journal of Army University of Medical Sciences of the I.R. 2002; 20 (3): 223-6.[Persian]
6. Moellering Jr RC. Emergence of Enterococcus as a significant pathogen. Clinical Infectious Diseases. 1992:1173-6.
7. Rahimi MK. Zinsser Microbiology. Aeeizh publisher; 2003.
8. An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. Journal of biomedical materials research. 1998; 43(3): 338-48.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 2:15 +0430 on Thursday July 19th 2018

9. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. Journal of medical microbiology. 2007; 56(12): 1581-8.
10. Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in microbiology. 2001; 9(1):34-9.
11. Krieg NR. Bergeys Manual of determinative for Bacteriology. Williamsand Wilkins, New York; 1998.
12. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical microbiology reviews. 2002; 15(2):167-93.
13. Gubner R, Beech I. The effect of extracellular polymeric substances on the attachment of Pseudomonas NCIMB 2021 to AISI 304 and 316 stainless steel. Biofouling. 2000; 15(1-3): 25-36.
14. Nickel J, Ruseska I, Wright J, Costerton J. Tobramycin resistance of Pseudomonas aeruginosa cells growing as a biofilm on urinary catheter material. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1985;27(4):619-24.
15. Gilmore M, Coburn P, Nallapareddy S, Murray B. The Enterococci: Pathogenesis. Molecular Biology and Antibiotic Resistance and Infection Control Wiley. 2002:301-54.
16. Matsukawa M, Kunishima Y, Takahashi S, Takeyama K, Tsukamoto T. Bacterial colonization on intraluminal surface of urethral catheter. Urology. 2005;65(3):440-4.
17. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by Enterococcus faecalis. Infection and immunity. 2004; 72(10): 6032-9.
18. Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by Enterococcus faecalis. Infection and immunity. 2004; 72(6):3658-63.
19. An FY, Sulavik MC, Clewell DB. Identification and Characterization of a Determinant (eep) on the Enterococcus faecalisChromosome That Is Involved in Production of the Peptide Sex Pheromone cAD1. Journal of bacteriology. 1999; 181(19): 5915-21.
20. Cerca N, Martins S, Cerca F, Jefferson KK, Pier GB, Oliveira R, et al. Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2005; 56(2):331-6.
21. Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American journal of clinical pathology. 1966;45(4):493-6.
22. Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. Clinical microbiology reviews. 1993; 6(4):428-42.
23. Cooper R, Snyder NJ, Zweifel MJ, Staszak MA, Wilkie SC, Nicas TI, et al. Reductive alkylation of glycopeptide antibiotics: synthesis and antibacterial activity. The Journal of antibiotics. 1996; 49(6):575-81.
24. Gordon S, Swenson JM, Hill B, Pigott N, Facklam R, Cooksey R, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. Enterococcal Study Group. Journal of clinical microbiology. 1992; 30(9): 2373-8.
25. Lewis CM, Zervos M. Clinical manifestations of enterococcal infection. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 1990;9(2):111-7.
26. Patterson JE, Sweeney AH, Simms M, Carley N, Mangi R, Sabetta J, et al. An analysis of 110 serious enterococcal infections: epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome. Medicine. 1995;74(4):191-200.
27. Aleyasin A, Mobarez AM, Sadeghizadeh M, HosseiniDoust R, Khoramabadi N. [Résistance to vancomycin in Entrococcus faecium and E.faecalis clinical isolation]. Pak. J. Med. Sci. 2007; 23(3): 390-3 . [Persian]
28. Coquet L, Junter G, Jouenne T. Resistance of artificial biofilms of Pseudomonas aeruginosa to imipenem and tobramycin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1998; 42(6): 755-60.
29. Meredith K, Bolhuis A, O'Neill M. Enterococcal surface protein Esp affects antibiotic sensitivity in Enterococcus faecium.

International journal of antimicrobial agents. 2009; 34(4): 392-3.
30. de Marques EB, Suzart S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical Enterococcus faecalis strains isolated in Londrina, Brazil. Journal of medical microbiology. 2004;53(11):1069-73.
31. Giacometti A, Cirioni O, Schimizzi A, Del Prete M, Barchiesi F, D'errico M, et al. Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. Journal of clinical microbiology. 2000;38(2):918-22.
32. Layton B, Walters S, Boehm A. Distribution and diversity of the enterococcal surface protein (esp) gene in animal hosts and the Pacific coast environment. Journal of applied microbiology. 2009;106(5):1521-31.
33. Heikens E, Bonten MJM, Willems RJL. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of Enterococcus faecium E1162. Journal of bacteriology. 2007; 189(22): 8233-40.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 2:15 +0430 on Thursday July 19th 2018