

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

فاطمه کاظمینی^۱، کیومرث امینی^{۱*}(PhD)

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 faecalis*) به عنوان عامل ایجاد عفونت‌های بیمارستانی دارای فاکتورهای بیماری‌زایی است که در کلونیزاسیون، مقاومت به سیستم ایمنی، رقابت با سایر میکروارگانیسم‌ها و ایجاد آسیب بواسطه تولید فاکتورهای ترش‌خی 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.

نتیجه‌گیری: 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 می‌باشند 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 میکروارگانیسم‌ها و نیز ایجاد آسیب بواسطه تولید فاکتورهای ترش‌خی و غیره دخالت دارند. انتروکوک‌ها عفونت‌های خطرناکی همچون باکتری، 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 (۲و۳). انتروکوک‌ها در مقایسه با باکتریهای 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 گلبول‌های 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 باکتری‌ها به یکدیگر و ایجاد توده سلولی می‌گردد. همچنین این ماده نقش مهمی در تحریک چسبندگی، تهاجم به سلول و تخریب بافت‌های میوکارد و ریه ایفا می‌کند (۹-۱۱). پروتئین سطحی انتروکوک (ESP) وظایف تقریباً 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 می‌شود (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 دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه می‌باشد

* مسئول مقاله: دکتر کیومرث امینی

آدرس: ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی ساوه، گروه میکروبیولوژی. تلفن: ۰۸۶-۴۲۳۴۱۵۱۱

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

نمونه مدفعی از بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی کرمان از خرداد تا آذر ماه ۱۳۹۳ جمع آوری شد. این نمونه‌ها جهت کشت بر روی محیط‌های بلاداآگار، 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 فکالیز 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 فکالیز 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 (ependorff) 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 ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه می‌باشد (۲۷).

مخلوط مواد استفاده شده جهت انجام واکنش Multiplex-PCR شامل: آب مقطر ۹/۶ میکرولیتر، PCR buffer 10X 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 هر کدام ۱/۵ میکرولیتر، آنزیم Taq unit ۲/۵ به میزان ۰/۳ میکرولیتر، نمونه DNA ۴ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر می‌باشد (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.

عفونتها گونه انتروکوک فکالیز مقاوم به ونکومايسين می‌باشد (۱۵). در تحقیقی بیشترین فراوانی مربوط به ژنهای ژلاتیناز و همولیزین در بین انتروکوک‌ها گزارش شده است (۱۶). انتروکوک فکالیزهای 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 فکالیز حاوی ژن سیتولیزین و ۴۸ درصد ژلاتیناز مثبت گزارش شده اند (۱۸). Eaton و همکاران به این نکته اشاره می‌نمایند که انتروکوک فکالیز 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 فراوانی 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 ویرولاانس 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 فکالیز جدا شده از نمونه‌های مدفعی به روش Multiplex-PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

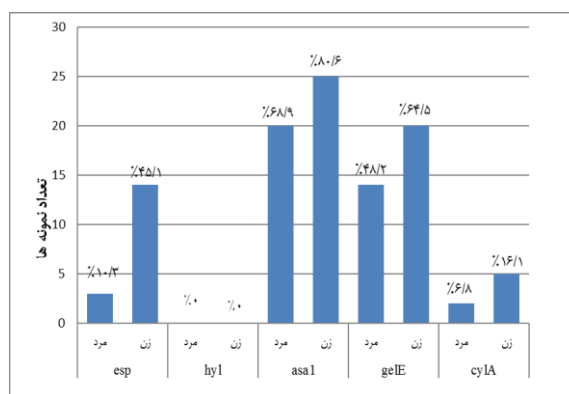
جمع‌آوری نمونه‌ها و جداسازی: در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، با استفاده از فرمول حجم نمونه و سطح اطمینان ۹۵٪ و خطای قابل قبول ۰/۰۵، تعداد ۲۰۰

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

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

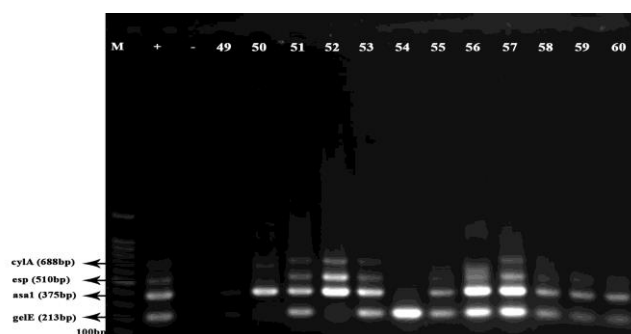
یافته ها

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 فکاليس جداسازی شده در بیماران به تفکیک جنس مشخص نمود که بیشترین فراوانی باکتری انتروکوک فکاليس 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 شکل ۱ ذکر شده است.



نمودار ۱. توزیع فراوانی ژنهای حدت انتروکوک فکاليس 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 فکاليس در زنان ۵۲ درصد بوده که در مقایسه با مردان دارای فراوانی بیشتر می‌باشد که این میزان آلودگی به خصوص در زنان نقش مهمی در بیمارزایی دارد. همچنین در این مطالعه میزان فراوانی 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 فکاليس و متعاقباً حضور ژنهای حدت این باکتری شده است. فاکتورهای ویروالانس در انتروکوکوس فکاليس شامل ترکیبات aggregation (Agg)، پروتئین سطحی انتروکوک (Esp)، همولیزین (hyl) که دارای فعالیت باکتریسیدهال، 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 بیمارزایی انتروکوک فکاليس می‌باشد. با تاکید بر این نکته که تاکنون هیچ توکسین پروتئینی در انتروکوک‌ها شناسایی نشده است، احتمالاً بیمارزایی آن به واسطه فعالیت مجموعه‌ای از فاکتورها و آنزیم‌های تولیدی باکتری، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فاکتور تجمعی شرکت کننده در تبادل پلاسمیدی صورت می‌پذیرد (۲۹). نتایج تحقیق Mozafari و همکاران نشان داد که فرانکس تولید فاکتورهای ویروالانس همولیزین، ژلاتیناز، همگلوتنین، دزوکسی‌ریبونوکلئاز و تولید فرمون یا فاکتور تجمعی در گونه‌های فکاليس بیشتر از گونه‌های فاسیوم بوده است (۲۵). در بررسی Ghasemi و همکاران از ۹۵ سویه انتروکوکوس فکاليس، 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 می‌رسد که 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 بخش‌های بیمارستانی مختلف، ۷۳ مورد (۴۶/۵٪) انتروکوک فکاليس 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 نمونه‌ها 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 می‌باشد. در مطالعه Vankerckhoven و همکاران در ۲۷۱ نمونه جدا شده از انتروکوک فکاليس، ۱۳۵ مورد از آنها مقاومت دارویی داشتند. فراوانی ژن *esp* در نمونه‌های مدفوعی ۷۳٪ و فراوانی ژن *hyl* در نمونه‌های 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 جداسازی شده 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 نشده‌اند. با توجه به نقش پروتئین سطحی انتروکوک که توسط ژن *esp* کروموزومی رمزدهی می‌شود با افزایش بیمارزایی، کلونیزاسیون، پایداری در مجاری ادراری و تشکیل بیوفیلم همراه است و در اتصال اولیه و تشکیل بیوفیلم انتروکوکوس فکاليس دخالت دارد که در کلونیزه شدن و بقای انتروکوکوس فکاليس در عفونت‌های مجاری ادراری در مدل‌های حیوانی نشان داده شده است (۳۲ و ۹۱ و ۹۲). پروتئین سطحی، در مقادیر بالا در ایزوله‌های مولد

توجه به این نکته، فراوانی 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 ایزوله‌های 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 می‌گردد. 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 می‌توان 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 می‌باشد که از نسلی از باکتری به نسل بعد نیز از طریق ژنتیکی انتقال می‌یابد و می‌تواند با استفاده از روش‌هایی که قادر به شناسایی سوبه‌های حاد و تشخیص گسترده آنها باشند در طراحی راهکارهای پیشگیری کننده و کنترل انتشار این سوبه‌ها مهم می‌باشند.

تقدیر و تشکر

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

اندوکاردیت و باکتری می‌مشاهده شده ولی به ندرت در ایزوله‌های 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 geIe، ۴۹/۵٪ از نظر esp و asa1 در ۵۳/۶٪ از بیماران مثبت بودند (۴).

آنزیم ژلاتیناز، توسط ژن geIe 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 (۱۹و۲۳). 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 انتروکوکوی 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، باکتری می‌و 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 ویرولاکس مهم، در نظر گرفته شد (۲۹). با

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

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, Tabor 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 Med 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, *hlyEfm*, 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 in *Enterococcus 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.

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 *Enterococcus faecalis* 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 the picardy 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 Clin Microbiol 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 *Enterococcus 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 *Enterococcus faecium* 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.