Archive of SID

انتقال ژن‌های بیماری‌زایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گونه‌های انتروکوک از طریق کانجوگاسیون

*دکتر نور امیرمظفری I
مسعود آل‌بویه II
هما فروهش III

چکیده

زمینه و هدف: انتروکوک‌ها شامل گروه مهم و متنوعی از باکتری‌ها هستند که موجب ایجاد بیماری در انسان و حیوان می‌گردند. این باکتری‌ها در دستگاه گوارش انسان و حیوان، در خاک، آب و موادغذایی وجود دارند و قابلیت رشد در محیط‌هایی با غلظت بالای نمک و گستره وسیعی از pH را دارند. انتروکوک توانایی اکتساب مقاومت‌های دارویی و همچنین سایر فاکتورهای بیماری‌زایی را دارا می‌باشد. در این تحقیق، شیوع فاکتورهای مختلف ویرولانس در میان سویه‌های انتروکوک جدا شده از نمونه‌های مختلف کلینیکی در مقایسه با سویه‌های جدا شده از گروه‌های کنترل مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی ـ تحلیلی، سویه‌های انتروکوک جدا شده از نمونه‌های کلینیکی و افراد سالم از نظر فاکتورهای ویرولانس از قبیل تولید همولیزین، ژلاتیناز، هماگلوتینین، دزوکسی ریبونوکلئاز و تولید فرمون یا فاکتور تجمعی بررسی و در نهایت با استفاده از تست‌های t و chi-square مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. میزان حساسیت باکتری‌های فوق نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های گوناگون نیز تعیین گردید. توانایی تبادل پلاسمیدی در سویه‌های فوق با دو روش mating که نشانه کانجوگاسیون است مورد آزمایش قرار گرفت.

یافته‌ها: فرکانس تولید ژلاتیناز، فاکتور تجمعی و همولیزین در گونه‌های فکالیس بیشتر از گونه‌های فاسیوم بود. اختلاف قابل توجه آماری در سایر خصوصیات بین گونه‌های فکالیس و فاسیوم دیده نشد. پلاسمیدهای پاسخ‌دهنده به فرمون در اکثر گونه‌ها شایع بوده و توانایی انتقال با فرکانس بالا را داشتند. فرکانس تبادل پلاسمیدی در سویه‌های ایزوله شده حدود 10^{-7}-10^{-4} بود. پروفایل پلاسمیدی باکتری‌ها مشخص نمود که اغلب ایزوله‌ها حاوی یک و یا چند پلاسمید با وزن مولکولی در حدود ۹۸-۳ مگادالتون بودند. دو ایزوله مقاومت کامل نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌های تحت بررسی از خود نشان دادند. ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز توانایی زیادی جهت تبادل و انتقال میان گونه‌ها به واسطه کانجوگاسیون از خود نشان دادند. حضور فاکتور تجمعی در گونه‌های جدا شده از موارد بالینی بسیار شایع‌تر از ایزوله‌های کنترل بود($p<0/001$).

نتیجه‌گیری: با توجه به این که تاکنون هیچ توکسین پروتئینی در انتروکوک‌ها شناسایی نشده است، احتمالاً بیماری‌زایی آن‌ها به واسطه فعالیت مجموعه‌ای از فاکتورها و آنزیم‌های تولیدی باکتری، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فاکتور تجمعی شرکت کننده در تبادل پلاسمیدی صورت می‌پذیرد. اهمیت این باکتری‌ها در پزشکی مربوط به مقاومت بالای آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها و ایجاد عفونت‌های بیمارستانی در افراد بستری و بیماران ضعیف می‌باشد. حضور بیشتر و معنی‌دار فاکتور تجمعی در انتروکوک‌های جدا شده از بیماران در مقایسه با گونه‌های مرتبط با افراد سالم، بیانگر نقش بارز پروسه کانجوگاسیون در انتقال فاکتور بیماری‌زایی در انتروکوک‌ها می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: ۱ – انتروکوک ۲ – کانجوگاسیون ۳ – ژن‌های بیماری‌زایی ۴ – مقاومت آنتی‌بیوتیکی

تاریخ دریافت: ۸٤/٤/٤، تاریخ پذیرش: ۸٤/۸/۱۷

مقدمه

انتروکوک‌ها گروه مهم و متنوعی از باکتری‌ها را تشکیل داده و ارتباط پیچیده‌ای با انسان دارند. برخی از گونه‌ها در صنایع غذایی کاربرد داشته، در حالی که تعدادی از آن‌ها موجب ایجاد بیماری‌های مختلف در

I) دانشیار میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، مرکز علوم پایه، بزرگراه همت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران(*مؤلف مسؤول).
II) کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران.
III) مربی و کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران.

www.SID.ir

Archive of SID

انسان و حیوانات می‌گردند. این باکتری‌ها همچنین به عنوان فلور طبیعی در دستگاه گوارش انسان و حیوان، خاک، آب و موادغذایی وجود دارند. انتروکوک‌ها می‌توانند در ۱۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد، در محیط‌هایی با غلظت نمکی بالا و در گستره وسیعی از PH رشد نمایند. به علاوه انتروکوک‌ها دارای توانایی اکتساب فاکتورهای مقاومت دارویی متعددی هستند که مشکلات جدی در کنترل و مراقبت بیماران مبتلا به عفونت‌های انتروکوکی ایجاد می‌نمایند.[۱]

با وجودی که مطالعاتی بر روی فاکتورهای ویرولانس این باکتری‌ها انجام شده است ولی تاکنون در میان سویه‌های مختلف جدا شده از افراد سالم و بیمار، فاکتورهای ویرولانس شاخص که بتوان بیماری‌زایی را به آن‌ها نسبت داد یافت نگردیده است. شایع‌ترین عوامل مسبب بیماری‌های انسان توسط این گروه از باکتری‌ها، دو گونه انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم می‌باشند.[۲]

گر چه تا کنون هیچ توکسین مترشحه پروتئینی در انتروکوک‌ها شناسایی نشده است، احتمالاً بیماری‌زایی آن‌ها به واسطه فعالیت مجموعه‌ای از فاکتورهای دخیل در بیماری‌زایی همچون پروتئین‌ها یا کربوهیدرات‌های شرکت کننده در اتصال باکتری به اپی‌تلیوم دستگاه گوارش و تناسلی، فاکتور تجمعی شرکت کننده در تبادل پلاسمیدی و سایر عوامل صورت می‌پذیرد.[۳]

در این تحقیق، بر آن شدیم تا مجموعه‌ای از فاکتورهای گوناگون مرتبط با ویرولانس و مقاومت دارویی رایج در گونه‌های انتروکوک جدا شده از بیماران را با ایزوله‌های مربوط به افراد سالم مقایسه نماییم. همچنین با توجه به این که کانجوگاسیون از مهم‌ترین روش‌های تبادلات ژنتیکی در باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد؛ میزان انتقال فاکتورهای مرتبط با بیماری‌زایی را از طریق کانجوگاسیون در نمونه‌های انتروکوک جدا شده بررسی نمودیم.

روش بررسی

تعداد ۱۱۷ سویه انتروکوک مورد مطالعه از نمونه‌های کلینیکی در طول دی‌ماه ۱۳۸۱ لغایت تیر ۱۳۸۲ جداسازی گردید. هر یک از نمونه‌های جدا شده به یک فرد بیمار تعلق داشت. اغلب نمونه‌های مربوط به ادرار(۱۰۹ مورد) بودند و مابقی آن‌ها از زخم جداسازی شدند. نمونه‌ها از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان کسری و مرکز تحقیقاتی ـ آموزشی علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی ایران در تهران گردآوری گردید. همچنین تعداد ۳۷ گونه انتروکوک جدا شده از مدفوع افراد سالم نیز به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه از نوع مقطعی ـ تحلیلی بوده و نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون‌های t و chi-square مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت.

سوسپانسیون غلیظ از نمونه انسانی در آب پپتونه تهیه و سپس به محیط انتروکوکسل آگار(ساخت شرکت BBL) تلقیح گردید. این محیط حاوی آزاید بوده و با ممانعت از رشد باکتری‌های گرم منفی، امکان رشد انتروکوک‌ها را میسر می‌سازد. همچنین با هیدرولیز اسکولین در محیط فوق، انتروکوک‌ها کلنی‌های سیاه‌رنگی به وجود می‌آورند. سپس با انجام آزمون‌های بیوشیمیایی از قبیل رشد در حضور NaCl ۶/۵ درصد، هیدرولیز هیپورات، هیدرولیز اسکولین در حضور ۲۰-۱۰ درصد صفرا، تخمیر سوربیتول و احیای تلوریت؛ باکتری‌های ایزوله شده تعیین گونه شدند.[۴]

از سویه استاندارد *E.faecalis* ATCC 19433 جهت کنترل کیفی محیط‌های کشت و آزمون‌های تشخیصی استفاده گردید. جهت بررسی فاکتورهای ویرولانس، باکتری‌های فوق از نظر تولید همولیزین، ژلاتیناز، هماگلوتینین، دزوکسی ریبونوکلئاز و تولید فرمون یا فاکتور تجمعی مورد بررسی قرار گرفتند.

جهت بررسی مقاومت دارویی با روش استاندارد Kirby Bauer، مقاومت سویه‌های جداسازی شده در هر دو گروه بیمار و کنترل نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین، پنی‌سیلین، جنتامایسین، اریترومایسین، کلرامفنیکل و ونکومایسین ارزیابی شد. به منظور به دست آوردن میزان مقاومت، تمامی سویه‌هایی که به روش دیسک دیفیوژن از خود مقاومت نشان می‌دادند، با روش رقت‌سازی بررسی و

www.SID.ir

Archive of SID

مقدار MIC(Minimal Inhibitory Concentration) در آن‌ها تعیین گردید.

فاکتور تجمعی، هم در کلنیزاسیون باکتری و هم در تسهیل و پیش‌برد تبادل پلاسمید دخالت دارد. جهت بررسی حضور آن ابتدا فرمون تولیدی از سویه استاندارد *E.faecalis* JH2-2 جداسازی می‌شود. مایع رویی حاوی فرمون را با سوسپانسیون کشت تازه باکتری مورد نظر در میکرو پلیت‌های کشت سلولی مجاور می‌کنیم. پس از ۳ الی ۲٤ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، می‌توان تشکیل تجمع یا کلامپ باکتری‌هایی را که نشانه تبادل ژنتیکی کانجوگاسیون می‌باشد مشاهده نمود.

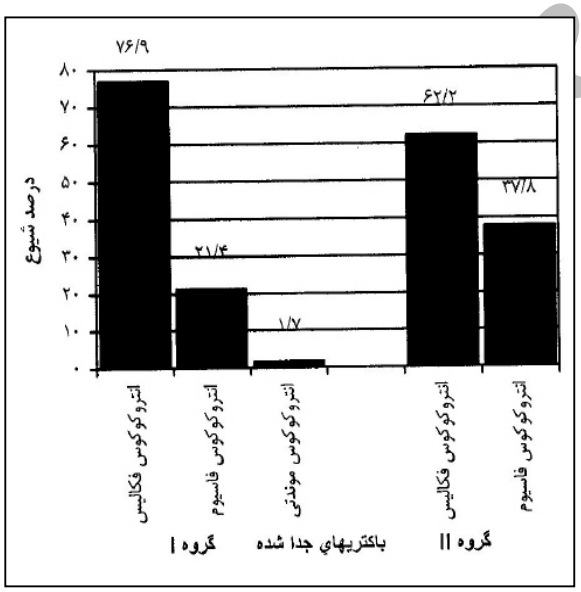
برای تهیه DNA پلاسمیدی، ابتدا یک کلنی از باکتری در محیط BHI(Brain Heart Infusion) برات، وارد گردید. بعد از یک شبانه‌روز گرم خانه گذاری و انجام سانتریفوژ، سلول‌ها به روش قلیایی متلاشی شدند. ابتدا رسوبات باکتریایی در محلول I(گلوکز/EDTA/Tris-Cl) شناور شده و سپس، محلول II(سود/SDS) به آن اضافه و به آرامی با برگرداندن لوله مخلوط گردید. سپس محلول III(استات پتاسیم و اسید استیک گلاشیال) به آن افزوده و بعد از مخلوط شدن به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. پس از سانتریفوژ، محلول رویی نخست با مخلوط هم حجم فنل - کلروفرم و سپس با کلروفرم برای دوبار خالص‌سازی گردید. محلول پلاسمیدی با اتانول رسوب‌گذاری و در نهایت رسوب پلاسمیدی به دست آمده در بافر TE حاوی ۲۰ میکروگرم RNAase در هر میلی‌لیتر از حجم نهایی، حل گردید.[۵]

الکتروفورز افقی بر روی ژل آگاروز ۰/۷۵ درصد و درون بافر TBE(Tris-cl-Boric Acid=EDTA) انجام گرفت. نمونه‌ها پس از مخلوط کردن، با لودینگ بافر وارد چاهک شدند. باندهای DNA بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدم بروماید زیر نور UV مشاهده گردید. از پلاسمیدهای موجود و خالص شده از باکتری‌های *E.coli* V517 و *E.coli* 39R861 به عنوان مارکر استانداردهای وزن مولکولی استفاده گردید.

بررسی تبادل ژنتیکی کانجوگاسیونی بین گونه‌های انتروکوک با هر دو روش Filter mating و Broth mating انجام گرفت. به منظور بررسی امکان تبادل ترانسپوزون‌های کد کننده مقاومت دارویی، دو سویه کلینیکی فاقد پلاسمید ولی حاوی ژن‌های مقاومت دارویی مستقر بر روی ترانسپوزون انتخاب شدند. سویه‌های ترانس کانجوگانت بروی محیط‌های حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مناسب در شرایطی که تنها این باکتری‌ها قابل رشد باشند، انتخاب گردیدند. در نهایت سلول‌های ترانس کانجوگانت به دست آمده از نظر الگوی پلاسمیدی و هضم آنزیمی مورد مقایسه قرار گرفتند. آنزیم مورد استفاده Hin dIII بود.

یافته‌ها

در میان ایزوله‌های انتروکوک مورد بررسی از افراد سالم و گروه بیمار، بیشترین گونه جدا شده در هر دو گروه متعلق به گونه فکالیس بود(نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱- درصد شیوع باکتری‌های انتروکوک جدا شده از افراد بیمار(گروه I) و افراد سالم(گروه II)

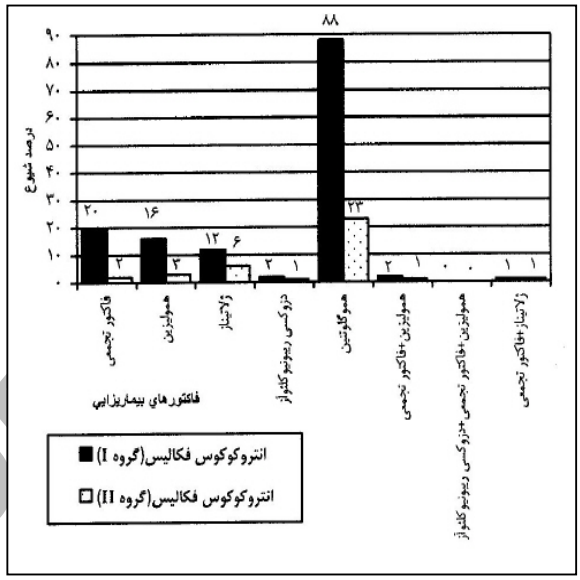
این گونه ۷۳/٤ درصد از کل انتروکوک‌های جدا شده را به خود اختصاص می‌داد. انتروکوکوس فاسیوم در رده دوم

www.SID.ir

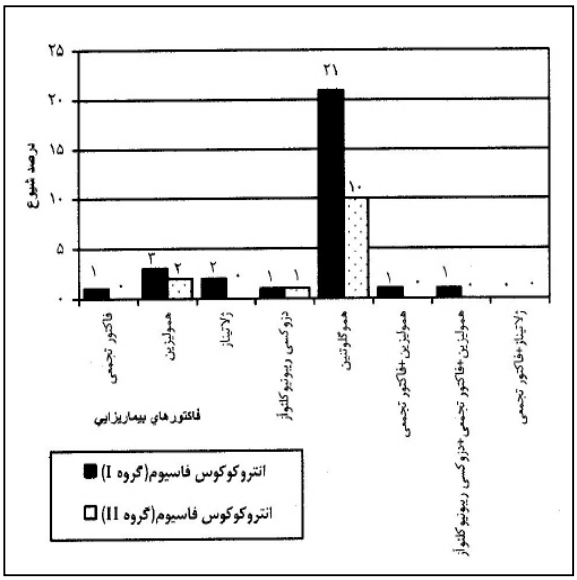
Archive of SID

جداسازی قرار داشت و ۲۵/۳ درصد از کل باکتری‌های جدا شده را شامل می‌شد. تنها دو مورد انتروکوکوس موندتی نیز فقط از افراد بیمار جداسازی گردید(۱/۳٪).

فاکتورهای تولیدی بررسی شده توسط گونه‌های انتروکوکوس فکالیس و فاسیوم جداسازی شده در نمودارهای شماره ۲ و ۳، به ترتیب، نشان داده شده است.



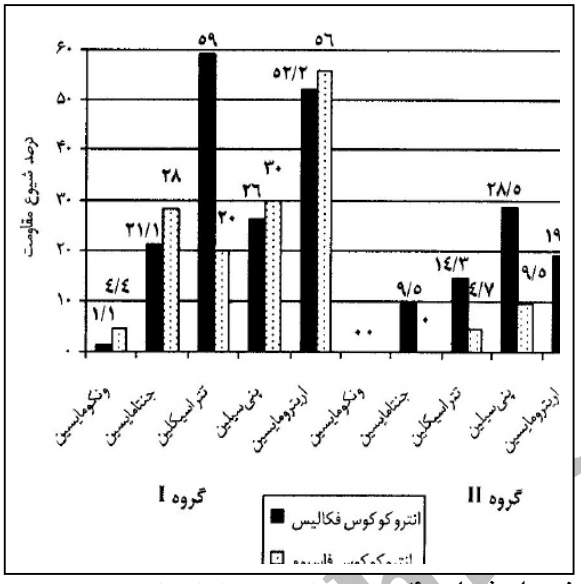
نمودار شماره ۲- مقایسه فاکتورهای بیماری‌زایی گونه‌های انتروکوکوس فکالیس جدا شده از بیماران(گروه I) و افراد سالم(گروه II)



نمودار شماره ۳- مقایسه فاکتورهای بیماری‌زایی انتروکوکوس فاسیوم در گروه‌های I(بیماران) و II(داوطلبین سالم)

اکثریت سویه‌ها توانایی تولید هماگلوتینین را داشتند. تولید فرمون یا فاکتور تجمعی در سویه‌های جدا شده از بیماران ۱۸/٦ درصد مشاهده گردید که به صورت معنی‌دار بیشتر از گونه‌های جدا شده از افراد سالم(٥/٤٪) بود.

مقاومت سویه‌های جدا شده به آنتی‌بیوتیک‌ها در نمودار شماره ٤ نشان داده شده است. همان طوری که ملاحظه می‌گردد، میزان مقاومت دارویی در سویه‌های جدا شده از بیماران به مراتب بیشتر از گونه‌های موجود در افراد سالم می‌باشد.



نمودار شماره ۴- میزان مقاومت انتروکوک های جدا شده از افراد بیمار(گروه I) و افراد سالم(گروه II) به آنتی‌بیوتیک‌ها

میزان مقاومت براساس MIC سویه‌های تحت بررسی و طبق جدول راهنمای مرکز بین‌المللی استانداردهای آزمایشگاه‌های کلینیکی(NCCLS) مورد تفسیر قرار گرفت.[٦] براساس جداول NCCLS، مقادیر MIC بالاتر از $۵۰۰\mu gml^{-1}$ برای جنتامایسین، $۱٦\mu gml^{-1}$ برای تتراسایکلین، $۱٦\mu gml^{-1}$ برای پنی‌سیلین G، $۸\mu gml^{-1}$ برای اریترومایسین و $۳۲\mu gml^{-1}$ برای ونکومایسین به عنوان مقاوم در نظر گرفته شد. چهار سویه *E.faecium* و شش سویه *E.faecalis* به چندین آنتی‌بیوتیک مقاومت هم‌زمان نشان داده(Multiple Drug Resistant) و دو عدد از این

www.SID.ir

Archive of SID

باکتری‌ها به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاوم بودند.

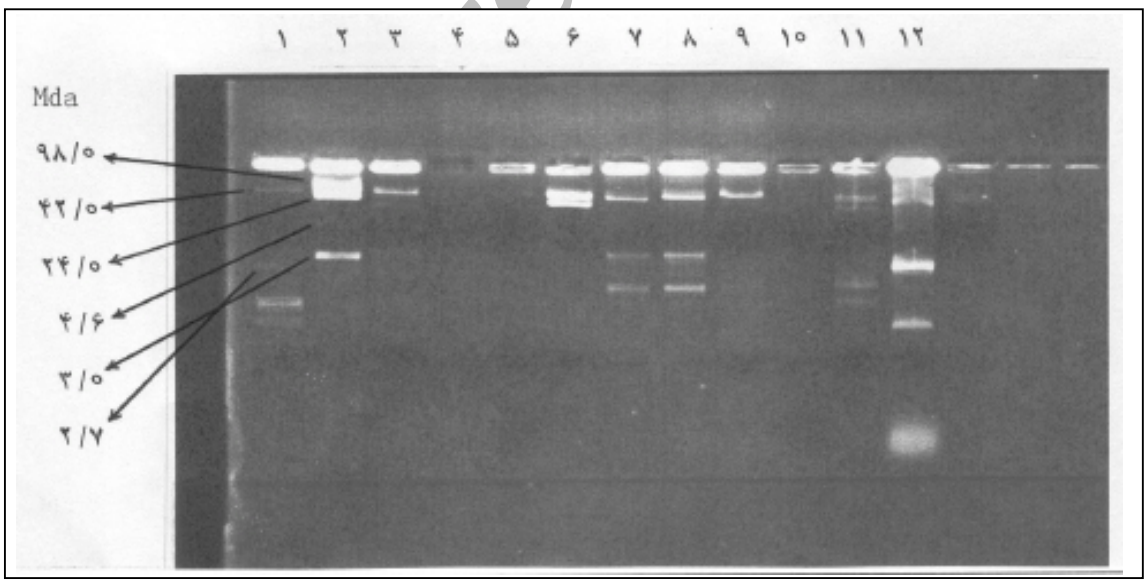
مقادیر MIC دو سویه مقاوم به ونکومایسین که هر دو از گروه بیمار جدا شده بود، عبارت بود از $٦٤\mu gml^{-١}$ و $١٢٨\mu gml^{-١}$. شش سویه *E.faecalis* و دو سویه *E.faecium* که جزو سویه‌های MDR هستند، جهت انجام کانجوگاسیون انتخاب شدند.

نمودار پلاسمید تهیه شده از سویه‌های فوق نشان داد که تمامی آن‌ها حاوی یک پلاسمید ٤٢مگادالتون می‌باشند. علاوه به آن، دو سویه نیز دارای پلاسمید ٩٨مگادالتون، دو سویه دیگر دارای پلاسمید ٢٠مگادالتون و همچنین پلاسمیدهایی با وزن مولکولی ٢٢ و ٧ و ٣ مگادالتون در سه سویه دیگر یافت گردید(تصویر شماره ١). پس از انجام کانجوگاسیون، میان سویه‌های کلینیکی(حساس به ریفامپین) و سوش گیرنده *E.faecalis* JH2-2(تولید کننده فرمون و مقاوم به ریفامپین و اسید فوسیدیک)، سلول‌های ترانس کانجوگانت بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مربوط جداسازی شدند.

جهت ارزیابی توانایی انتقال ژنتیکی، با محاسبه نسبت سلول‌های ترانس کانجوگانت حاصل شده به باکتری‌های دهنده، فرکانس تبادل ژنتیکی به دست آمد.

این میزان برای پلاسمیدهای مختلف تا حدودی متفاوت و در دامنه ٤×١٠^{-٧} الی ٤×١٠^{-٤} قرار داشت. همچنین انجام کانجوگاسیون با دو روش filter mating و Broth mating، نتایج نسبتاً مشابه‌ای را برای اغلب سویه‌ها به همراه داشت. فقط در تعداد اندکی از باکتری‌ها و برای ژن‌های مقاومت به جنتامایسین و تتراسیکلین، کانجوگاسیون با روش filter mating باعث ایجاد تعداد بیشتری سلول‌های ترانس کانجوگانت گردید.

علاوه بر شاخص‌های مقاومت دارویی، بعضی از فاکتورهای بیماری‌زایی مانند همولیزین، فاکتور تجمعی و در یک مورد، DNase نیز در ترانس کانجوگانت یافت شد. همچنین یکی از سلول‌های ترانس کانجوگانت، به طور هم زمان چندین فاکتور مقاومت دارویی را کسب نمود.



تصویر شماره ١- نمای ژل آگاروز الکتروفورز شده از DNAهای پلاسمیدی استخراج شده از سویه‌های انتروکوک. خط ١ و ٢ بیانگر مارکرهای وزن مولکولی پلاسمیدهای حلقوی استخراج شده، به ترتیب، از باکتری *E.coli* V517 و *E.coli* 39R861 می‌باشند. خط ٣ الی ١٢ بیانگر پلاسمیدهای موجود در باکتری‌های انتروکوک جدا شده از موارد کلینیکی بوده که کد کننده ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک و فاکتورهای بیماری‌زایی می‌باشند.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

با افزایش روز افزون مقاومت دارویی در انتروکوک‌ها، اهمیت بررسی فاکتورهای مرتبط با کلونیزاسیون و پاتوژنز این باکتری‌ها ضروری به نظر می‌رسد. پروتئین‌هایی همچون همولیزین، ژلاتیناز و فاکتور تجمعی (Agglutination Substance)، در سیستم‌های تبادل پلاسمیدی شرکت می‌جویند. این پروتئین‌ها به همراه سایر فاکتورها در بیماری‌زایی انتروکوک‌ها شرکت دارند، هر چند نقش دقیق آن‌ها در عفونت‌زایی نامشخص باقی مانده است.[۷]

همولیزین در مدل‌های حیوانی به عنوان فاکتور ویرولانس مطرح شده است. در یک مطالعه که بر روی رت انجام شده بود، بیشترین میزان مرگ و میر در ارتباط با سویه‌های دارای فاکتور همولیزین(سیتولیزین) ذکر گردید.[۸] در مطالعه حاضر، ۱۷/۸ درصد از سویه‌های متعلق به گونه فکالیس جدا شده از بیماران در مقابل ۱۲ درصد از گونه فاسیوم، همولیتیک بودند که این میزان در سویه‌های جدا شده از افراد سالم به ترتیب ۱۳ درصد و ۱٤/۳ درصد به دست آمد.

تولید فاکتور تجمعی در انتقال کانجوگاتیو پلاسمیدهای پاسخ دهنده به فرمون و ترانسپوزون‌ها دخالت داشته و موجب بروز فنوتیپ توده‌ای شدن(Clumping) می‌گردد. Kreft و همکاران، دخالت این فاکتور را در اتصال انتروکوک‌ها به سلول‌های کلیه نشان دادند و پیشنهاد نمودند که این فاکتور احتمالاً در پاتوژنز این دسته از باکتری‌ها دخیل است.[۹] از طرف دیگر، یافته متناقضی در گزارش Dupont و همکاران مبنی بر این که در مدل موش، حضور فاکتور تجمعی اختلاف معنی‌داری در میزان مرگ و میر این حیوان ایجاد نمی‌کند ارایه گردید.[۱۰]

هر چند در این گزارش بیان گردید که حضور همزمان فاکتور تجمعی و سیتولیزین میزان تلفات را بالا می‌برد. این نتایج در مدل اندوکاردیت خرگوش نیز تایید گردید.[۱۳-۱۰] در این بررسی، حضور فاکتور تجمعی در گونه‌های فکالیس جدا شده از موارد بالینی، بسیار شایع‌تر از ایزوله‌های کنترل بود(۲۲/۲٪ در مقابل ۸/۷٪). این نتایج با مطالعه Elsner و همکاران که درصد شیوع فاکتور تجمعی را حدود ۱۳درصد گزارش نمودند، همخوانی دارد.[۲]

دخالت ژلاتیناز در بیماری‌زایی انتروکوکوس فکالیس در مدل حیوانی به اثبات رسیده است[۱۱]، ولی اطلاعات کمی در رابطه با اهمیت آن جهت پاتوژنز انسان وجود دارد. Gutshik گزارش نموده بود که سویه‌های پروتئولیتیک انتروکوکوس فکالیس، بیماری‌زا تر از سویه‌های غیر پروتئولیتیک می‌باشند. وی این تحقیق را بر روی مدل حیوانی خرگوش به منظور بررسی اندوکاردیت انتروکوکی انجام داد.[۱۲] میزان شیوع فاکتور ژلاتیناز در این مطالعه حدود ۱۳درصد و ۸درصد به ترتیب در گونه‌های فاسیوم و فکالیس جدا شده از بیماران گزارش گردید که با مطالعات دیگر محققین همخوانی دارد.

مطالعات بسیار اندکی روی نقش آنزیم DNase در بیماری‌زایی انتروکوک تاکنون صورت پذیرفته است. در این مطالعه، تعداد باکتری‌های جدا شده از بیماران و افراد سالم که تولید کننده این آنزیم بودند در حد ۵-۲ درصد بود. با توجه به توانایی مشاهده شده انتروکوک‌ها برای انتقال این فنوتیپ در طی مراحل کانجوگاسیون، در این تحقیق، اهمیت مطالعه و بررسی بیشتر بر نقش این فاکتور روشن می‌گردد. آگلوتیناسیون اریتروسیت‌ها نیز یک معیار مناسب در ارزیابی توانایی اتصال باکتری‌ها بوده و در مطالعات قبلی نیز حضور این فاکتور نشان داده شده است.[۱۵، ۱٤] احتمالاً این ساختارها شامل اتصالات پروتئینی و یا غیرپروتئینی می‌باشند.

در اغلب مطالعات قبلی، حضور این فاکتور در بیشتر از ۹۰ درصد سویه‌ها گزارش شده است که مشابه نتایج حاصله در این مطالعه می‌باشد. اختلاف زیادی در میان دو گروه بررسی شده از نظر مقاومت دارویی مشاهده گردید. این شاخص در میان اعضای گروه کنترل بسیار پایین‌تر از گروه بیمار می‌باشد. به جز در مورد تتراسیکلین، مقاومت دارویی برای سایر آنتی‌بیوتیک‌ها در گونه‌های فاسیوم جدا شده از بیماران بیشتر از مقاومت‌های مشاهده شده در گونه‌های فکالیس بود.

www.SID.ir

Archive of SID

سویه‌های بالینی، بیشترین مقاومت را در برابر آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و تتراسیکلین از خود نشان دادند. آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در محیط‌های بیمارستانی، انتخاب انتروکوک‌های پاتوژن را تحت تاثیر قرار داده، به گونه‌ای که بر تعداد سویه‌های دارای مقاومت چند دارویی و بعضاً سویه‌های مقاوم به همه آنتی‌بیوتیک‌ها افزوده می‌شود. از سوی دیگر، مقاومت دارویی به تنهایی توجیه کننده بیماری‌زایی انتروکوک‌ها نبوده و احتمالاً سایر خصوصیات بیماری‌زایی مانند توانایی اتصال، انتشار و فرار از سیستم ایمنی در کنار شاخص‌های مقاومت دارویی در این امر دخیلند. بررسی ترانس کانجوگانت‌ها نشان داد که شاخص‌های مقاومت در برابر تتراسیکلین، اریترومایسین و جنتامایسین به میزان زیادی قابلیت انتقال را دارا می‌باشند. در حالی که ژن مقاومت به پنی‌سیلین فقط در یک سویه باکتری فوق منتقل گردید. همچنین سویه‌هایی که دارای همولیزین و DNase بودند، توانستند این ویژگی را به ترانس کانجوگانت‌ها منتقل نمایند. این ویژگی در مورد همولیزین قبلاً نشان داده شده بود، ولی توانایی انتقال دزوکسی‌ریبونوکلئاز، برای اولین بار است که گزارش می‌شود.[۱۶، ۱۵، ۷]

با توجه به سهولت انتقال ژن‌های بیماری‌زایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان سویه‌های انتروکوک و همچنین احتمالاً به سایر باکتری‌های گرم مثبت؛ شناسایی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک انتروکوک در محیط‌های کلینیکی می‌تواند به عنوان یک زنگ خطر تلقی گردد.

عدم امکان بررسی میزان توانایی انتقال ژن‌های مقاومت و بیماری‌زایی بین گونه‌های انتروکوک و سایر باکتری‌ها در این تحقیق می‌تواند نشانگر میزان خطرساز بودن انتروکوک‌های مقاوم به وانکومایسین و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها برای سایر باکتری‌های بیماری‌زا باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به آن که تنها چند عدد از فاکتورهای مورد بررسی در این مطالعه تفاوت قابل ملاحظه‌ای را در میان ایزوله‌های کلینیکی و کنترل دارا بودند و با توجه به مقاومت دارویی بسیار گسترده مشاهده شده در نمونه‌های کلینیکی، به نظر می‌رسد که در مراکز درمانی، آنتی‌بیوتیک‌ها نقش مهمی در روند بیماری‌زایی انتروکوک‌ها بر عهده داشته باشند. به دنبال مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در این مراکز، گونه‌های بیماری‌زای کد کننده فاکتورهای بیماری‌زایی، به سرعت تکثیر یافته و بر سایر باکتری‌های فلور غلبه می‌یابند. با افزایش جمعیت این باکتری‌ها، احتمالاً غلظت فاکتورهای القایی مترشحه افزایش یافته و در پی آن، ژن‌های کد کننده شاخص‌های دخیل در پاتوژنز و انتشار باکتری بیان می‌گردند.

با توجه به نتایج حاصله از این مطالعه و مشاهده توانایی انتقال شاخص‌های ویرولانس مانند همولیزین، دزوکسی ریبوکلئاز و فاکتور تجمعی به سایر سویه‌ها در همراهی با شاخص‌های مقاومت در برابر تتراسیکلین، اریترومایسین و جنتامایسین و شناسایی سیستم‌های بیان فاکتورهای بیماری‌زایی تحت شرایط رشد و محیطی خاص در درون بدن، مانند سیستم Quarum Sensing، به نظر می‌رسد، مطالعه هر چه بیشتر مکانیسم بیماری‌زایی و پاتوژنز این باکتری‌ها که اغلب به عنوان فلور نرمال در انسان مطرح می‌باشند، می‌توانند راه‌کارهای جدید و مناسبی را در پیشگیری و درمان عفونت‌های شایع بیمارستانی حاصله از این ارگانیسم‌ها، حاصل آورند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران جهت فراهم‌آوری منابع مالی و همچنین از ریاست محترم و کارکنان زحمت‌کش بخش میکروب‌شناسی مرکز تحقیقاتی ـ آموزشی علوم آزمایشگاهی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی ایران که در انجام این تحقیق کمک و یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1- Huyeke MM, Gilmore MS. Multiple drug resistant Enterococci: the nature of the problem and agenda for future.

www.SID.ir

Emerg Infect Dis 1999; 4: 149-239.

2- Elsner HA, Sobottka I, Mack D, Claussen M, Laufs R, Wirth R. Virulence factors of enterococcus faecalis and enterococcus faecium blood culture isolate. Eur J Clin Mircobiol Infect Dis 2000; 19: 39-42.

3- Eaton TH, Gilmore MS. Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Microbiology 2001; 67(4): 1628-1635.

4- Facklam RR, Collin MD. Identification of enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme. J Clin Microbiol 1989; 27(4): 731-734.

5- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold spring harbor laboratory press; p: 1.32-1.34.

6- National committee for clinical laboratory standards (NCCLS); Performance standard for antimicrobial susceptibility testing, ninth informal supplement. Wayne, Pennsylvania. Vol. 19; 1999. P: 1-4.

7- Coque T, Patterson T, Steckelberg J, Murray E. Incidence of hemolysin, gelatinase and aggregative substance among enterococci isolates from patients with endocarditic and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. J Infect Dis 1994; 171: 1223-1229.

8- Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB. Hemolysin of sterptococcus faecalis subspecies zymogens contributes to virulence in mice. Infect Ummun 1984; 45: 528-530.

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

10- Dupont H, Montravers P, Mohler J, Carbon C. Disparate findings on the role of virulence factors of enterococcus faecalis in mouse and rat models of peritonitis. Infect Immun 1998; 66: 2570-2575.

11- Singh KV, Qin X, Weinstock GM, Murray BE. Generation and testing of mutants of enterococcus faecalis in a mouse peritonitis model. J Infect Dis 1998; 178: 1416-1420.

12- Gutschik E, Moller S, Christensen N. Experimental endocarditis in rabbits; Significance of the proteolytic capacity of the infecting strains of streptococcus faecalis. Acta Pathol Microbiol Scand[B] 1979; 87: 353-362.

13- Chow JW, Thal LA, Perri MB, Vazquez JA, Donabedian SM, Clewell DB, et al. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 2474-2477.

14- Carvalho Mda G, Teixeira LM. Hemagglutination properties of enterococcus. Curr Microbiol 1995; 30: 265-268.

15- Dunny GM. Genetic functions and cell-cell interactions in the pheromone-inducible plasmid transfer system of enterococcus faecalis. Mol Microbiol 1990; 4: 689-696.

16- Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 513-522.

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID

Conjugational Plasmid Transmissibility of Virulence-Related and Antibiotic Resistance Genes Among Enterococcal Isolates

***N. Amir Mozafari, Ph.D.**[I] **M. Alebouyeh, MSc**[II] **H. Forouhesh, MSc**[III]

Abstract

Background & Aim: Enterococci comprise an important and diverse group of bacteria that cause disease in human and animals. They reside in the gastrointestinal tract of human and animal, soil, water, foods, and can persist in elevated salt contents and various pH values. They can readily acquire antibiotic resistance and various other virulence factors. In this study, the prevalence of various virulence factors among different clinical isolates versus those isolated from healthy individuals was compared.

Material & Methods: In this analytic cross-sectional study, enterococcal strains isolated from clinical and healthy cases were tested for various virulence related properties such as hemolysin, gelatinase, hemoglutinin, DNase, and fremone(aggregative substance) production. T-test and chi-square test were used for analysis of the data and their antibiotic resistance patterns were also determined. The ability to exchange resident plasmids via conjugation was tested by two different mating protocols.

Results: The frequency of gelatinase, aggregation substance, and hemolysin production was higher in E.faecalis relative to those in E.faecium. However, no statistically significant difference was detected in the other trains. Fremone-responsive plasmids were common in most isolates and had the ability to transfer between strains with high frequency(10^{-4}-10^{-7}). Most isolates contained one or more plasmids in the 3-98 MDa range. Two isolates showed total resistance to all of the antibiotics tested. Antibiotic resistance genes had the ability for conjugational inter-strain transfer. The prevalence of aggregative substance in the strains isolated from clinical cases was much higher than those obtained from the control group($P<0.001$).

Conclusion: Since no known protein ecotoxin was identified in enterococci, their pathogenic potential may be attributed to a variety of extracellular enzymes, antibiotic resistance, aggregative substance, and other factors. Their importance in medicine is related to their ability to acquire antibiotic resistance and cause nosocomial infections in hospitalized and debilitated patients. The statistically significant higher proportion of aggregative substance in enterococci spp, isolated from sick people in comparison with those obtained from healthy cases, points to the pivotal role conjugational gene transfer may play in the acquisition of pathogenic potential.

Key Words: 1) Enterococci 2) Conjugation 3) Virulence Genes 4) Antibiotic Resistance

***I*)** *Associate Professor of Microbiology. School of Medicine. Basic Sciences Center, Microbiology Department. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.(*Corresponding Author)*
***II*)** *MSc in Microbiology. Microbiology Department, Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*
***III*)** *MSc in Microbiology. Instructor. Microbiology Department, Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*

www.SID.ir