

## شناسایی انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم در نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های تهران با روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی به همراه بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها در سال ۱۳۹۴

نویسندگان:

سارا معصومی زواریانی<sup>۱</sup>، رضا میرنژاد<sup>۲\*</sup>، شهره زارع کاریزی<sup>۱</sup>، وهاب پیرانفر<sup>۳</sup>، عدرا باقری بجستانی<sup>۴</sup>

- ۱- گروه میکروبی‌شناسی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
 ۲- مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران  
 ۳- گروه میکروبی‌شناسی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران  
 ۴- مرکز تحقیقات بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 14, No.3, Fall 2016

## چکیده:

**مقدمه:** اپیدمیولوژی عفونت انتروکوکوی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. همچنین تشخیص دقیق سویه‌های بیماری‌زا، در روند کنترل مقاومت میکروارگانیسم‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند مؤثر باشد. این مطالعه با هدف استفاده از روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی برای تشخیص گونه‌های انتروکوکوس‌های ایزوله شده از بیمارستان‌های شهر تهران و بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها انجام گرفت.

**روش کار:** این مطالعه بر روی ۴۰۰ نمونه بالینی از بیمارستان‌های شهر تهران در طی سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ انجام شد. برای شناسایی انتروکوک از کشت‌های اختصاصی و تست‌های بیوشیمیایی برای شناسایی گونه‌های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم استفاده شد. روش PCR به منظور شناسایی گونه‌های انتروکوک به کار گرفته شد. حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن کربی-بائر و معیار CLSI و اندازه‌گیری MIC و آنکومایسین به روش برات دلوشن انجام پذیرفت.

**یافته‌ها:** از ۴۰۰ نمونه جمع‌آوری شده، ۲۷۸ نمونه انتروکوک تشخیص داده شد. بر اساس روش‌های فنوتیپی، ۷۰/۸۶٪ سویه‌ها انتروکوکوس فکالیس و ۱۵/۴۶٪ انتروکوکوس فاسیوم و ۱۳/۶۸٪ سایر گونه‌های انتروکوک بود. با استفاده از روش PCR، ۷۲/۳٪ انتروکوکوس فکالیس، ۱۰/۴۳٪ انتروکوکوس فاسیوم و ۱۷/۲۷٪ سایر گونه‌های انتروکوک تشخیص داده شد. نتایج آنتی‌بیوگرام بیشترین مقاومت را به کوئین پریستین - دالفوپریستین ۸۳/۳۴٪ و کمترین مقاومت را به لینزولاید ۱/۴۱٪ نشان داد. همچنین مقاوم به وانکومایسین در ۹ مورد ۵/۹۵٪ با MIC  $\geq 512 \mu\text{g/ml}$  مشاهده گردید.

**نتیجه‌گیری:** تشخیص سریع می‌تواند به منظور جلوگیری از شیوع گسترده انتروکوکوس‌ها مفید باشد. همچنین با توجه به فراوانی سویه انتروکوک مقاوم به وانکومایسین، ضرورت کاربرد اقدامات پیشگیرانه نشان داده شد. با توجه به الگوهای مقاومت، به منظور تجویز مناسب آنتی‌بیوتیک، انجام آزمون آنتی‌بیوگرام برای هر بیمار قبل از درمان پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فاسیوم، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، PCR

Pars J Med Sci 2016;14 (3):

## مقدمه:

مانند عفونت‌های دستگاه ادراری - تناسلی، اندوکاردیت، باکتری، عفونت زخم، عفونت داخل شکم، لگن و همچنین مننژیت در نوزادان را باعث شوند [۴-۲]. به طور معمول، انتروکوکوس‌ها، کوکسی‌های گرم مثبت تخمیری هستند که به

انتروکوکوس‌ها مهم‌ترین فلور طبیعی ساکن در دستگاه گوارش انسان و بسیاری از حیوانات هستند [۱]. این باکتری‌ها به دلیل فقدان توکسین‌ها و عوامل بیماری‌زای قوی، توانایی کمی در ایجاد بیماری دارند، با این وجود می‌توانند بیماری‌های مهمی

\* نویسنده مسئول، نشانی: مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران  
 تلفن تماس: ۰۹۳۵۳۸۳۶۲۵۶  
 پست الکترونیک: rmirnejad@bmsu.ac.ir

پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۱۶

اصلاح: ۱۳۹۵/۵/۲۳

دریافت: ۱۳۹۵/۲/۵

به‌خصوص PCR به عنوان روشی سریع و دقیق که دارای قابلیت تفکیک بالایی بین گونه‌ها است برای شناسایی باکتری‌های مختلف از جمله انتروکوکوس‌ها در خصوص بررسی شیوع بیماری استفاده شد [۲۱-۱۸]. از سوی دیگر، استفاده از روش‌های فنوتیپی در ارتباط با روش‌های ژنوتیپی مبتنی بر روش‌های مولکولی PCR می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در اختیار ما قرار دهند. این پژوهش با هدف شناسایی گونه‌های انتروکوکوس با استفاده از روش فنوتیپی و روش مولکولی PCR انجام شد. همچنین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌های ایزوله شده بررسی گردید.

## روش کار:

### جمع‌آوری نمونه‌ها

این پژوهش به صورت مقطعی - توصیفی روی ۴۰ نمونه بالینی از ادرار، زخم، خون، مایع آسیت و ... مشکوک به عفونت با انتروکوکوس به‌صورت نمونه‌گیری تصادفی ساده از بیمارستان‌های بقیه ... (عج) و میلاد شهر تهران (ایران) در طی ماه‌های فروردین ۱۳۹۳ تا بهمن ۱۳۹۴ انجام شد. نمونه‌ها در شرایط استریل و دمای چهار درجه سلسیوس از آزمایشگاه تشخیص طبی بیمارستان‌ها به آزمایشگاه تحقیقاتی منتقل شدند.

### شناسایی گونه انتروکوکوس به روش فنوتیپی

به‌منظور تعیین هویت گونه‌های انتروکوکوس به روش فنوتیپی، پس از تهیه کشت خالص ۲۴ ساعته، از نمونه‌های بالینی بر روی محیط Blood Agar، برای تمامی نمونه‌های کشت مثبت، رنگ‌آمیزی گرم، آزمون کاتالاز، هیدرولیز نمک‌های صغری (نمک‌های صغری ۴۰٪) و رشد در محیط BHI حاوی نمک ۶/۵٪ (کلرید سدیم) انجام شد [۱۶].

برای شناسایی افتراق گونه‌های انتروکوکوس از یکدیگر از آزمون تخمیر قند آرابینوز، مانیتول، سوربیتول، سوربوز، لاکتوز و ... در لوله‌های حاوی محیط فنل رد برات به نسبت یک درصد از قندهای ذکر شده و انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد. محیط فنل رد برات توسط اتوکلاو استریل شده و pH آن توسط NaOH استریل به ۷/۴-۷/۵ تنظیم شد. رنگ زرد محیط برات نشان‌دهنده مثبت بودن واکنش بود [۱۶].

### آزمون آنتی بیوگرام نمونه‌های بالینی

با استفاده از دیسک‌های جنتامایسین ۱۰μg، وانکومایسین ۳۰μg، تیکوپلانتین ۳۰μg، لینزولاید ۳۰μg، فسفومایسین ۵۰μg و

صورت دوتایی یا زنجیره‌های کوتاه دیده می‌شوند [۵]. این باکتری‌ها کاتالاز منفی، فاقد اسپور و بی‌هوازی اختیاری بوده که در نمک ۶/۵٪ (کلرید سدیم)، نمک‌های صغری ۴۰٪ و PH=۹/۶ رشد می‌کنند. انتروکوکوس‌ها در دمای ۴۵-۱۰ درجه سلسیوس قابلیت رشد دارند [۶]. همچنین انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم می‌توانند دمای ۶۰ درجه سلسیوس را به مدت ۳۰ دقیقه تحمل کنند که این مورد وجه تمایز این دو گونه از سایر گونه‌های انتروکوک است [۸، ۷]. بیماری‌زایی انتروکوکوس‌ها در اواخر قرن نوزدهم توسط هاستینگ و مک کالم گزارش شد [۸].

این باکتری‌ها در حال حاضر به‌عنوان عوامل عمده ایجادکننده عفونت، خصوصاً عفونت‌های بیمارستانی شناخته شده‌اند. امروزه اپیدمیولوژی عفونت انتروکوکوی توجه زیادی را به خود جلب کرده است و این موضوع باعث شد تغییرات چشمگیری در این زمینه رخ دهد که بر اساس اطلاعات سیستم‌های مراقبتی عفونت‌های بیمارستانی در آمریکا، انتروکوکوس‌ها به‌عنوان یکی از پاتوژن‌های مهم بیمارستانی در نظر گرفته شوند. این باکتری‌ها به عنوان چهارمین عامل عفونت‌های بیمارستانی و سومین عامل عفونت‌های باکتری می و دومین عامل عفونت‌های ادراری شناخته شده‌اند. مطالعات مختلف این جایگاه را ناشی از افزایش روز افزون مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در سراسر دنیا می‌دانند [۹]. با توجه به موارد بالا و این‌که باکتری‌های مذکور می‌توانند در طیف وسیعی از محیط زنده بمانند، تشخیص سویه‌های پاتوژن در کنترل و پیشگیری اهمیت ویژه‌ای دارند [۱۰]. همچنین تشخیص دقیق سویه‌های بیماری‌زا، در روند کنترل مقاومت میکروارگانیسم‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها مؤثر است. امروزه افزایش روز افزون مقاومت نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها یک مشکل عمده جهانی است. انتروکوکوس‌ها به‌صورت ذاتی مقاومت حد واسط به سفالوسپورین‌ها، پنی‌سلین‌ها و آمینوگلیکوزیدها دارند. از سال ۱۹۸۶ تا به امروز نیز گزارش‌هایی مبنی بر مقاومت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین که برای اولین بار در سال ۱۹۷۲ وارد گروه درمانی انتروکوکوس شد، نیز در حال افزایش است [۱۱-۱۳]. از این رو، اهمیت تشخیص دقیق و سریع سویه‌های بیماری‌زای انتروکوکوس باعث پیشرفت روش‌های تشخیصی و ایجاد روش‌های تشخیص جدید می‌شود [۱۴-۱۶].

در گذشته به منظور تشخیص عفونت‌های انتروکوکوی، از روش‌های فنوتیپی کلاسیک استفاده می‌شد. اگرچه این روش‌ها گاهی همراه با اطلاعات مفیدی هستند، ولی از قابلیت تفکیک بین گونه‌ها به اندازه کافی برخوردار نبوده و محدودیت‌هایی دارند [۱۷]. از سال ۱۹۹۰ میلادی، با توسعه روش‌های مولکولی

پرایمر (با غلظت ۱۰ پیکومول)، ۱۲ میکرو لیتر 2X Master mix (ساخت کمپانی Ampliqon III کشور دانمارک حاوی 20 mM dNTP، 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) و ۱۱ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر انجام شد. برنامه زمانی واکنش زنجیره پلی مرز در دستگاه ترموسایکلر (Humburg, Germany, Eppendorf) با شرایط دمایی دناتوراسیون اولیه به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و ۳۵ چرخه با دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، دمای واسرشت شدن ۵۵ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و دمای طول سازی اولیه ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه تنظیم شد. مرحله طولی سازی نهایی نیز در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی Safe Stain الکتروفورز و توسط دستگاه Gel Documentation (Cambridge, England, Uvitec) مشاهده شد.

در این پژوهش با شناسه ۱۰-۹۳ کلیه موارد اخلاق در پژوهش رعایت گردیده است.

کوئین پرستین - دالفوپریستین 15µg تهیه شده از شرکت Mast به روش دیفیوژن روی محیط مولر هینتون آگار (Merck) و سوسپانسیون میکروبی نیم مک فارلند انجام شد. فنوتایپ مقاومت بر اساس دستورالعمل CLSI تعیین شد. پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، حداقل غلظت مهاری قرائت و به منظور تعیین MIC انتروکوک‌های مقاوم به وانکومایسین از روش Broth Dilution استفاده شد. در این مطالعه از سویه استاندارد انتروکوکوس فکالیس ATCC 29212 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

### شناسایی گونه انتروکوکوس با روش PCR

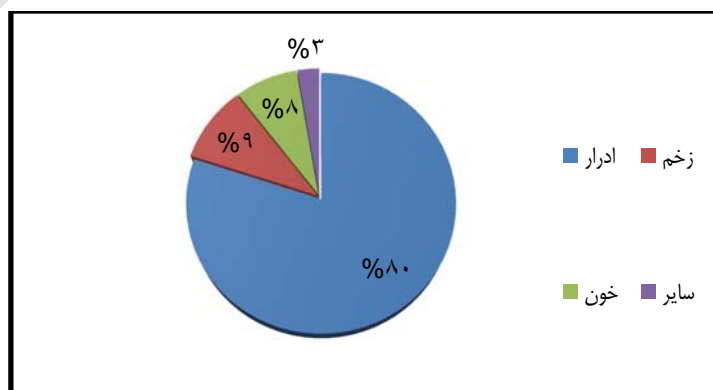
پس از استخراج ژنوم باکتری از نمونه‌های کشت مثبت با استفاده از روش جوشاندن، به منظور شناسایی گونه‌های انتروکوکوس از پرایمرهای اختصاصی گونه‌های (ddlE.faecalis و ddIE.faecium) استفاده شد [۱۷] (جدول ۱). واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر شامل ۱ میکرو لیتر DNA الگو (۰/۵ میکروگرم / میلی لیتر)، ۱ میکرو لیتر از هر

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر ژن ddIE.faecalis و ddlE.faecium

نام پرایمر	اندازه قطعه	Refrence
ddlE.faecalis	941 bp	[17]
ddlE.faecium	550 bp	[17]

### یافته‌ها:

در این پژوهش، از ۴۰۰ نمونه بالینی ایزوله شده موجود، ۲۷۸ نمونه انتروکوکوس تشخیص داده شد که ۸۰٪ از نمونه‌های شناسایی شده از ادرار جدا شدند. درصد فراوانی نمونه‌های ادرار، زخم، خون، واژینال، BAL و غیره در نمودار ۱ مشخص شده است. شرط سنی و جنسیتی برای جمع‌آوری نمونه‌ها اعمال نشد.



نمودار ۱: درصد فراوانی انتروکوک‌های جداسازی شده از نمونه‌های بالینی

### تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های جمع‌آوری شده توسط نرم‌افزار SPSS 16 با استفاده از آزمون فیشر و من-وینینی در سطح اطمینان ۹۵ درصد تحلیل شدند. مقدار  $P < 0.05$  به عنوان سطح معناداری آماری در نظر گرفته شد.

## تأیید گونه‌های انتروکوکوس توسط روش‌های فوتیپی:

نتایج حاصل از تعیین گونه با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی نشان داد که از ۲۷۸ نمونه، جنس انتروکوکوس تشخیص داده شد که با استفاده از آزمون‌های اختصاصی ۱۹۷ مورد انتروکوکوس فکالیس (۷۰/۸۶٪)، ۴۳ مورد انتروکوکوس فاسیوم (۱۵/۴۶٪) و ۳۸ ایزوله سایر گونه‌های انتروکوکوس (۱۳/۶۸٪) تشخیص داده شدند. از ۲۰۸ نمونه بیمارستان بقیه ... (عج)، ۱۳۷ (۶۵/۸۶٪) سویه انتروکوکوس فکالیس، ۳۲ (۱۵/۳۸٪) سویه انتروکوکوس فاسیوم و از ۷۰ نمونه بیمارستان میلاد، ۵۰ سویه (۷۱/۴۲٪) انتروکوکوس فکالیس و ۱۱ سویه (۱۵/۷۱٪) انتروکوکوس فاسیوم بودند.

## نتایج آزمون مقاومت آنتی‌بیوتیکی:

بر اساس تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، گونه‌های انتروکوکوس بیشترین مقاومت را به آنتی‌بیوتیک‌های کوئین

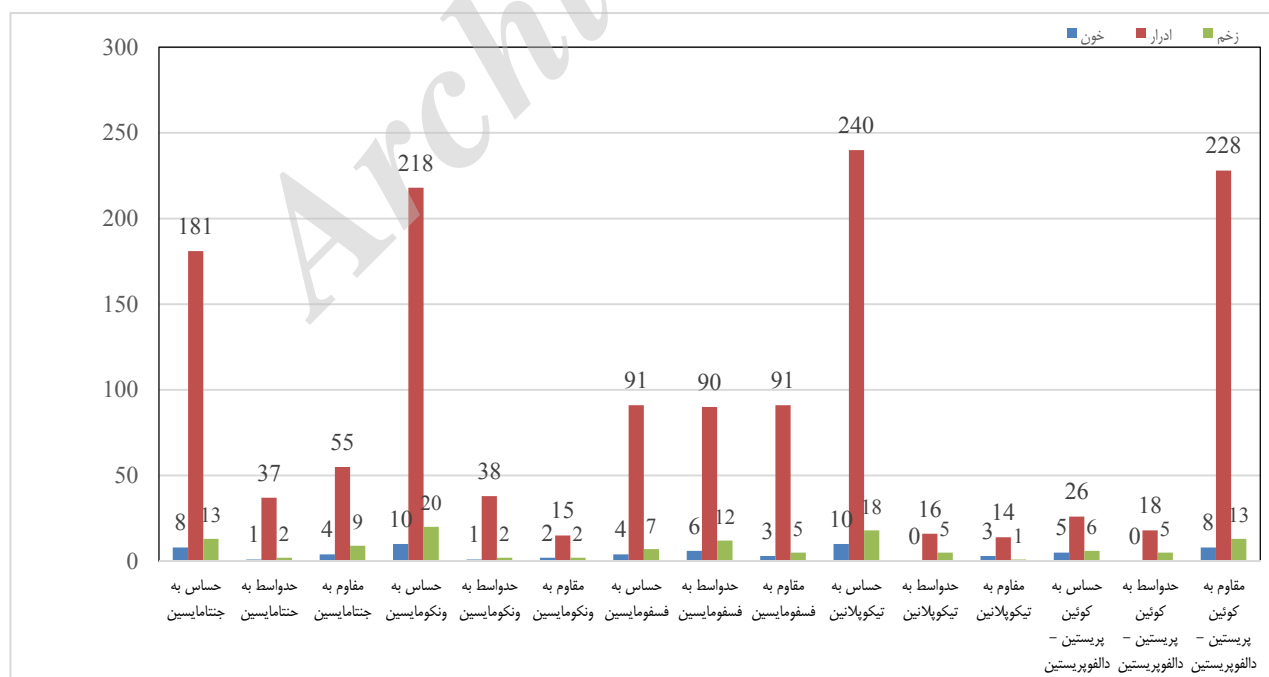
پریستین - دالفوپریستین ۸۳/۳۴٪ و فسفومایسین ۳۷/۸۴٪ و کمترین مقاومت ۱/۴۱٪ را به لینزولاید نشان دادند (جدول ۲ و نمودار ۲).

سویه‌هایی که برای آنتی‌بیوتیک وانکومایسین دارای قطر هاله  $\leq 14$  میلی‌متر بودند، برای تعیین MIC انتخاب شدند. ایزوله‌های مورد بررسی که به خوبی در اطراف دیسک 30  $\mu\text{g}$  وانکومایسین رشد کرده بودند، مقاومت سطح بالایی در برابر وانکومایسین داشتند ( $\text{MIC} \geq 512 \mu\text{g/mL}$ ). این نمونه‌ها شامل ۶ سویه انتروکوکوس فکالیس و ۳ سویه انتروکوکوس فاسیوم بودند.

از ۶ سویه انتروکوکوس فکالیس مقاوم به وانکومایسین ۲ سویه از بیمارستان بقیه ... (عج) و ۴ سویه از بیمارستان میلاد به دست آمد. همچنین ۱ سویه انتروکوکوس فاسیوم از بیمارستان بقیه ... (عج) تهران و ۲ سویه از بیمارستان میلاد تهران به دست آمد.

جدول ۲: نتایج بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در انتروکوکوس‌ها

نام آنتی‌بیوتیک	مقاومت کل	بقیه ... (عج)	میلاد
جنتامایسین	۲۰/۸۷٪	۱۵/۱۸٪	۲۶/۵۶٪
ونکومایسین	۵/۹۵٪	۲/۵۳٪	۹/۳۷٪
تیکوپلانین	۵/۳۲٪	۱/۲۶٪	۹/۳۸٪
فسفومایسین	۳۷/۸۴٪	۳۰/۳۷٪	۴۵/۳۱٪
لینزولاید	۱/۴۱٪	۱/۲۶٪	۱/۵۶٪
کوئین پریستین - دالفوپریستین	۸۳/۳۴٪	۸۱/۰۱٪	۸۵/۶۷٪



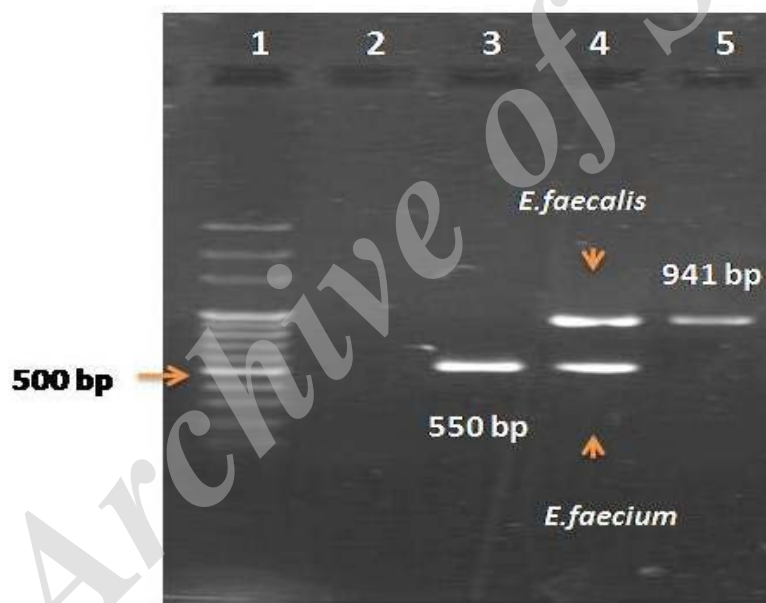
نمودار ۲: مقاومت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌های انتروکوکوس بر اساس محل به دست آمدن نمونه

## تأیید گونه‌های انتروکوکوس با روش مولکولی PCR:

همچنین نتایج حاصل از PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی نشان داد (شکل ۱) که از ۲۷۸ نمونه ای که توسط آزمون‌های فنوتیپی جنس انتروکوک تشخيص داده شده بودند با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم، ۲۰۱ سویه انتروکوکوس فکالیس (۷۲/۳٪) و ۲۹ سویه انتروکوکوس فاسیوم (۱۰/۴۳٪) و ۴۹ سویه سایر گونه‌های انتروکوکوس (۱۷/۲۷٪) تشخيص داده شدند. از ۲۰۸ نمونه‌های بیمارستان بقیه ... (عج)، ۱۵۴ (۷۰/۰۳٪) سویه انتروکوکوس فکالیس و ۲۱ (۱۰/۰۹٪) سویه انتروکوکوس فاسیوم و از ۷۰ نمونه بیمارستان میلاد، ۵۶ (۸۰٪) سویه انتروکوکوس فکالیس و ۸ (۱۱/۴۲٪) سویه انتروکوکوس فاسیوم تشخيص داده شد (جدول ۳). نتایج آنالیز آماری نمونه‌ها

نتایج تحلیل داده‌ها با آزمون من - ویتینی (جدول ۳) نشان داد که فراوانی انتروکوکوس در بیمارستان میلاد به صورت معناداری بیشتر از بیمارستان بقیه ... (عج) بوده است ( $P < 0.05$ ). نتایج تحلیل آماری آزمون فیشر با نرم‌افزار R، نشان داد که بر اساس منشأ نمونه‌ها، در نمونه‌های ادرار مقاومت به کوئین پرستین - دالفوپریستین به طور معناداری نسبت به مجموع تمام آنتی‌بیوتیک‌های دیگر شایع بود ( $P = 0.048$ ). در میان نمونه‌های زخم، بیشترین مقاومت به وانکومايسين و سپس جنتامایسین گزارش شد ( $P = 0.007$ ). در خون نیز مانند نمونه‌های به دست آمده از ادرار، کوئین پرستین - دالفوپریستین به طور معناداری شایع بود.

با تحلیل تمام الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی بدون در نظر گرفتن منشأ ایزوله‌ها، مشخص شد که بین مقاومت به وانکومايسين و مقاومت هم‌زمان نسبت به فسفومايسين ( $P = 0.488$ ) و تیکوپلانین ( $P = 0.310$ ) رابطه معناداری وجود ندارد.



شکل ۱: محصولات حاصل از PCR (چاهک ۱) مارکر (DNA 100bp)، چاهک ۲) محصول تکثیر یافته فاقد ژن از نمونه بالینی. چاهک ۳) محصول تکثیر یافته ژن *E. faecium* (550 bp) در نمونه بالینی مورد بررسی چاهک ۴) محصول تکثیر یافته هر دو ژن چاهک ۵) محصول تکثیر یافته ژن *E. faecalis* (941 bp) در نمونه بالینی مورد بررسی.

جدول ۳: فراوانی سویه‌های جداسازی شده از نمونه‌های بالینی در دو بیمارستان میلاد و بقیه ... (عج)

گونه باکتری	فراوانی کل	فراوانی در بقیه ... (عج)	فراوانی در میلاد
انتروکوکوس فکالیس	۷۰/۸۶٪	۶۵/۶۸٪	۷۱/۴۲٪
انتروکوکوس فاسیوم	۱۵/۴۶٪	۱۵/۳۸٪	۱۵/۷۱٪
سایر گونه‌ها	۱۳/۶۸٪	۱۸/۹۴٪	۱۲/۸۷٪
انتروکوکوس فکالیس	۷۲/۳٪	۷۰/۰۳٪	۸۰٪
انتروکوکوس فاسیوم	۱۰/۴۳٪	۱۰/۰۹٪	۱۱/۴۲٪
سایر گونه‌ها	۱۷/۲۷٪	۱۹/۸۸٪	۸/۵۸٪

**بحث:**

در مطالعه حاضر با استفاده از روش‌های فنوتیپی، ۷۰/۸۶٪ انتروکوکوس فکالیس، ۱۵/۴۶٪ انتروکوکوس فاسیوم و ۱۳/۶۸٪ سایر گونه‌های انتروکوک و با روش‌های مولکولی ۷۲/۳٪ انتروکوکوس فکالیس، ۱۰/۴۳٪ انتروکوکوس فاسیوم و ۱۷/۲۷٪ سایر گونه‌های انتروکوکوس گزارش شدند. فراوانی این مطالعه با پژوهش والان زولا و همکاران در سال ۲۰۱۴ که به‌منظور شناسایی گونه‌های انتروکوکوس و با استفاده از روش آزمون‌های بیوشیمیایی و روش مولکولی بر روی ۱۵۳ نمونه جدا شده از شیر و پنیر انجام گرفت هم‌خوانی دارد [۲۲]. همچنین نتایج مشابه با مطالعه چوتن و همکاران است [۲۳]. در مطالعه این محققین در ۲۷ کشور اروپایی، شیوع سویه‌های انتروکوکوس از تنوع بیشتری برخوردار بود. شناسایی این سویه‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی انجام گرفته بود که نتایج مشابه مطالعه حاضر است [۲۳]. مطابق نتایج به‌دست‌آمده، سویه‌های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم به ترتیب بالاترین درصد شیوع عفونت‌های انتروکوکوسی را به خود اختصاص می‌دهند.

همچنین با توجه به مطالعات مذکور، تشخیص صحیح انتروکوکوس در سطح گونه اهمیت چشمگیر دارد. از این رو، از روش PCR به‌عنوان روشی سریع و آسان برای تشخیص سریع گونه‌ها به‌منظور جلوگیری از شیوع گسترده انتروکوک می‌توان استفاده کرد. علاوه بر این، استفاده از روش‌های فنوتیپی به‌منظور شناسایی اولیه جنس انتروکوک، به دلیل شباهت ساختمانی و ظاهری با استرپتوکوک های گروه D می‌تواند مشکل‌ساز باشد.

مطالعاتی نیز وجود دارد که برخلاف نتایج مطالعه حاضر شیوع پائین تری از انتروکوکوس فکالیس را گزارش کرده‌اند. مطالعه لیبب و همکاران در سال ۲۰۱۳ در کشور مصر که به بررسی شناسایی گونه‌های انتروکوکوس باروش‌های فنوتیپی و مولکولی پرداخته نشان داد که تفاوت‌های آماری بین فراوانی انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم وجود دارد [۲۴]. همچنین در مطالعه لیبب و همکاران نشان داده شده که تفاوت‌های آماری بین تعداد سویه‌های تشخیصی وجود دارد که می‌توان به نوع مواد مصرفی، شرایط تهیه محیط‌های کشت مورداستفاده در روش‌های فنوتیپی اشاره کرد که این تغییرات را باعث می‌شود. در ایران نیز مطابق آخرین مطالعات انجام شده، از سال ۲۰۱۱ افزایش شیوع و مقاومت آنتی‌بیوتیکی گزارش شده است.

محمدی و همکاران در سال ۲۰۱۱ مطالعه‌ای را در کرمانشاه انجام دادند که از ۱۲۸ نمونه انتروکوکوس، ۵/۵ درصد آن‌ها مقاوم به وانکومايسين بودند [۲۵]. در مطالعه شکوهی‌زاده در سال ۲۰۱۴، ۱۹ سویه مقاوم از ۱۴۴ سویه را انتروکوکوس گزارش کرده است [۲۶]. در همین سال مؤدب و همکاران، ۲۲ سویه مقاوم را نیز از ۱۹۳ در بیمارستان زنجان گزارش کردند [۲۷]. در سال ۲۰۱۵ نیز عباسی و همکاران در ۱۰ سویه دارای ژنوتیپ مقاومت به وانکومايسين در شهرکرد گزارش شدند [۲۸]. وجه اشتراک تمام مطالعات موجود در ایران، شیوع بیشتر انتروکوکوس فکالیسدر مقایسه با انتروکوکوس فاسیوم است که با مطالعه حاضر نیز همخوانی دارد.

**نتیجه‌گیری:**

در مطالعه حاضر، تعداد تشخیص ایزوله‌های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم در روش‌های فنوتیپی و روش‌های ژنوتیپی متفاوت بود. به دلیل شباهت انتروکوک‌ها از لحاظ فنوتیپی با استرپتوکوک های گروه D و به استناد نتایج این مطالعه، می‌توان از روش‌های ژنوتیپی برای تشخیص جنس انتروکوکوس استفاده کرد، اما بهتر است از روش‌های ترکیبی فنوتیپی و ژنوتیپی به‌عنوان روش‌های مکمل یکدیگر به‌منظور تشخیص قطعی و سریع استفاده کرد. تشخیص سریع می‌تواند برای جلوگیری از شیوع گسترده انتروکوکوس ها مفید واقع شود. همچنین با توجه به فراوانی سویه انتروکوک مقاوم به وانکومايسين، ضرورت کاربرد اقدامات پیشگیرانه نشان داده شد. با توجه به الگوهای مقاومت، به‌منظور تجویز مناسب آنتی‌بیوتیک، انجام آزمون آنتی بیوگرام برای هر بیمار قبل از درمان توصیه می‌شود.

**تشکر و قدردانی:**

بدین‌وسیله از کلیه عزیزان مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) برای همکاری در انجام این پروژه، تشکر و قدردانی می‌شود.

**تعارض منافع:**

هیچ گونه تعارض منافع بین نویسندگان و مجله وجود ندارد.

## References:

1. Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, et al. Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev* 2012;76(4):685-706.
2. Huycke MM, Sahn DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis* 1998;4(2):239-49.
3. Arias CA, Murray BE. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 2012;10(4):266-78.
4. Henderson DA. The saga of smallpox eradication: an end and a beginning. *Can J Public Health*. 1979;70(1):21-7.
5. Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N (eds). *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston; 2014.
6. Agudelo Higueta NI, Huycke MM. Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N (eds). *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston; 2014.
7. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiol* 2009;155(Pt 6):1749-57.
8. Alipour M, Hajiesmaili R, Talebjannat M, et al. Identification and antimicrobial resistance of Enterococcus spp. isolated from the river and coastal waters in northern Iran. *Sci World J* 2014(2014):1-5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/287458>
9. Foulquie Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, et al. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 2006;106(1):1-24.
10. Van den Berghe E, De Winter T, De Vuyst L. Enterocin A production by Enterococcus faecium FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *Int J Food Microbiol* 2006 15;107(2):159-70
11. Sakka V, Tsiodras S, Galani L, et al. Risk-factors and predictors of mortality in patients colonised with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(1):14-21.
12. Nilsson O. Vancomycin resistant enterococci in farm animals - occurrence and importance. *Infect Ecol Epidemiol* 2012; 2(1): 1-9. Available from: URL <http://dx.doi.org/10.3402/iee.v2i0.16959>
13. Olawale KO, Fadiora SO, Taiwo SS. Prevalence of hospital-acquired enterococci infections in two primary-care hospitals in osogbo, southwestern Nigeria. *Afr J Infect Dis* 2011;5(2):40-6.
14. van Belkum A, Hermans PW, Licciardello L, et al. Polymerase chain reaction-mediated typing of microorganisms: tracking dissemination of genes and genomes. *Electrophoresis* 1998;19(4):602-7.
15. Ryan L, O'Mahony E, Wrenn C, et al. Epidemiology and molecular typing of VRE bloodstream isolates in an Irish tertiary care hospital. *J Antimicrob Chemother* 2015;70(10):2718-24.
16. Moraes PM, Perin LM, Junior AS, et al. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Braz J Microbiol* 2013;44(1):109-12.
17. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33(1):24-7.
18. Facklam RR, Carvalho MdGS, Teixeira LM. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics, and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. *The Enterococci: American Society of Microbiology*; 2002.
19. Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal Infection-Treatment and Antibiotic Resistance. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N (eds). *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston; 2014.
20. Heintz BH, Halilovic J, Christensen CL. Vancomycin-resistant enterococcal urinary tract infections. *Pharmacotherapy*. 2010;30(11):1136-49.
21. Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol* 2004;42(8):3558-65.
22. Valenzuela AS, Benomar N, Abriouel H, et al. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control* 2009;20(4):381-5.
23. Schouten MA, Voss A, Hoogkamp-Korstanje JA. Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci causing infections in Europe. The European VRE Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(10):2542-6.
24. Labib PL, Wing S, Bhowmik A. Transient hyperammonaemia in a patient with confusion: challenges with the differential diagnosis. *BMJ Case Rep* 2011;2011.
25. Mohammadi F, Tabaraie B, Davudian E, et al. Evaluation of drug resistance frequency among Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis strains and detection of vanA/B genes in vancomycin resistance isolated by PCR method in Ilam and Kermanshah hospitals. *Iran J Med Microbiol* 2011;5(1):14-8.
26. Shokoohzadeh L, Mohabati Mobarez A, Zali M, et al. Frequency of Vancomycin -Resistant Enterococcus Faecium Strains Isolated from Urinary Tract Infections (UTI) in 4 Hospitals of Tehran. *ZUMS J* 2014;22(91):121-30.
27. Moaddab SR, Kazemi Haki B, Ebrahimi AtashKhosroo N. Investigation of genes responsible for vancomycin resistance by Multiplex-PCR among enterococci isolated strains from inpatients and outpatients. *Med Sci J* 2015;24(4):227-34.
28. Abbasi S, Zamanzad B. Genotypic and Phenotypic Characteristics of Vancomycin-resistant Enterococcus Isolated from Clinical Specimens of Patients in Shahrekord. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015;24(122):98-106.

## Identification of *Enterococci faecalis* & *E. faecium* pathogens via Tehran hospitals clinical samples by phenotypic and genotypic methods and Evaluation of Antimicrobial Susceptibility in 2015

Sara Masoumi Zavaryani<sup>1</sup>, Reza Mirnejad\*<sup>2</sup>, Shohreh Zare Karizi<sup>1</sup>  
Vahhab Piranfar<sup>3</sup>, Ozra BagheriBejestani<sup>4</sup>

Received: 2016/24/04

Revised: 2016/13/08

Accepted: 2016/6/09

1. Dept of Microbiology, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Dept of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran
4. Health Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 14, No.3, Fall 2016

Pars J Med Sci 2016; 14(3):

### Abstract

#### Introduction:

Epidemiology of *Enterococcus* infections has attracted much attention. Precise identification of pathogenic strains can be effective in the control process of microorganism antibiotic resistance. This study aimed to identify the *Enterococcus* species isolated from hospitals in Tehran and examine their antibiotic resistance pattern by phenotypic and genotypic methods.

#### Methods & Materials:

This study was performed on 400 clinical samples from different hospitals in Tehran during 2015-2016. Specific cultures and biochemical tests were used to identify *Enterococcus*, distinguish *E. faecalis* and *E. faecium* species and PCR method was used to identify *Enterococcus* species. Antibiotic susceptibility was examined using Kirby-Bauer disc diffusion, and CLSI and vancomycin MIC were measured using broth dilution.

#### Results:

Of the 400 samples, 278 *Enterococcus* species were recognized. Phenotypic methods recognized 70.86% *E. faecalis*, 15.46% *E. faecium* and 13.68% other species. PCR identified 72.3% *E. faecalis*, 10.43% *E. faecium* and 17.27% other *Enterococcus* species. Results of the antibiograms showed the highest resistance (83.34%) to quinupristin/dalfopristin, and the lowest (1.41%) to linezolid. Also, resistance to vancomycin was observed in 5.95% with MIC  $\geq$  512  $\mu$ g/ml in 9 cases.

#### Conclusion:

Rapid diagnosis can prevent massive outbreaks of *Enterococcus*. Given the prevalence of vancomycin resistance in *Enterococcus*, preventive measures are imperative. The right antibiotics should be prescribed according to the resistance patterns after susceptibility test is performed for each patient.

**Keywords:** *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, Antibiotic Resistance, PCR

\* Corresponding author, Email: rmirnejad@bmsu.ac.ir