جداسازی و شناسایی مولکولی آنتروکوکوس‌ها و بررسی حضور ژن بیماری‌زای سایتولیزین (cyl) از نمونه‌های ادراری

زینب توفیق[1]، محسن زرگر[2*]، عباس اخوان سپهی[3]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.
۳. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۰)

چکیده

سابقه و هدف: انتروکوکوس ها یکی از عوامل مهم عفونت های بیمارستانی می باشند. جنس انتروکوکوس ۳۸ گونه دارد که مهمترین آنها انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم می باشند. انتروکوکوس ها به دلیل ایجاد باکتریمی، عفونت دستگاه ادراری، اندوکاردیت، مننژیت و عفونت زخم اهمیت به سزایی پیدا کرده اند.

مواد و روش کار: ۲۸۰ نمونه ادرای جمع آوری شده از آزمایشگاه های تشخیص طبی در تهران مورد استفاده قرار گرفت. برای جداسازی و شناسایی باکتری ها از محیط کشت آگار خوندار و محیط اختصاصی کانامایسین اسکولین آزید آگار استفاده گردید و سپس کلنی های باکتری ها توسط روش های بیوشیمیایی شناسایی شدند. همچنین تایید مولکولی باکتریها توسط کیت مولکولی اختصاصی انتروکوکوس ها انجام گرفت. در نهایت حضور ژن سایتولیزین (cyl) در جدایه ها توسط روش PCR مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج: از بین ۲۸۰ نمونه بررسی شده تعداد ۵۰ نمونه(۱۸٪) گونه *انتروکوکوس فکالیس* شناسایی نهایی شد. حضورژن سایتولیزین در ۳۴ ٪ از جدایه ها توسط روش PCR تایید گردید.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده نشان می دهد که انتشار آنتروکوکوس های حاوی ژنهای بیماریزا در بین بیماران دارای عفونت ادراری می تواند برای سلامت آنها خطرناک باشد. این نتایج توجه بیشتر به رعایت بهداشت فردی را نشان می دهد.

کلیدواژگان

انتروکوکوس فکالیس، ژن های ویرولانس، سایتولیزین، عفونت ادراری.

* نویسنده مسئول، رایانامه: zmohsen2002@yahoo.com

مقدمه

آنتروکوکوس ها کوکسی های گرم مثبت، بدون اسپور با زنجیره های کوتاه و بی هوازی اختیاری می باشند(۱). آنتروکوکوس ها متعلق به گروه باکتری های اسید لاکتیک می باشند که به صورت گسترده ای در طبیعت یافت می شوند. این باکتری ها، ساکنان دستگاه گوارش انسانها و حیوانات می باشند(۲). این باکتریها در حضور نمک ۶/۵٪ قادر به رشد می باشد. در مقابل نمک های صفراوی ۴۰٪ می تواند مقاومت کنند(۳). گونه های بیماریزای *انسانی* اغلب شامل دو گونه *آنتروکوکوس فکالیس* و *آنتروکوکوس فاسیوم* می باشند.

فاکتورهای بیماریزایی در حقیقت مولکول هایی هستند که توسط پاتوژن ها برای تقویت بقاء و تشدید بیماریزایی تولید می شوند که با تشکیل کلنی هجوم به سیستم ایمنی و سرکوب سیستم ایمنی ایفا نقش می کنند. با توجه به اینکه باکتری توانایی تولید توکسین مثل سایر باکتری ها را ندارد ولی دارای فاکتورهای بیماریزایی می باشد که توسط آنها ایجاد بیماری می کند(۴). تعدادی از فاکتورهای بیماریزایی در انتروکوکوس ها که شناسایی شده اند، عبارتند از: موادتجمعی(agg)، سایتولیزین(cyl)، ژلاتیناز(gel)، هیالورونیداز(hyl)، فرومون های جنسی(cpd، ccf)، کلاژن اتصالی(ace) و پروتئین سطحی(esp)(۵).

سایتولیزین پروتیین همولیز کننده ای است که توسط انتروکوکوس ها تولید می شود. ژن کد کننده ی این پروتیین در اپرونی یافت می شود که می تواند بر روی پلاسمید حمل می شود و یا با کروموزوم باکتریایی یکی می شود(۶-۸). سایتولیزین در حقیقت به همولیزین معروف است. سایتولیزین در انسان بتا همولیتیک می باشد و علیه دیگر باکتری های گرم مثبت نیز فعالیت دارد(۹). انتروکوکوس های دارای سایتولیزین فعالیت باکترویوسینی علیه باکتری های گرم مثبت را دارند، ولی اثر آنها بر روی باکتری های گرم منفی گزارش نشده است و این تصور می رود که به آنها امتیاز انتخابی برای رشد و زنده ماندن می دهد(۱۰). بیشتر جدایه های انتروکوکوس باکتریمی دهنده دارای سایتولیزین می توانند باعث لیز ماکروفاژها و نوتروفیل ها شود که توانایی آنتروکوکوس ها برای گرفتن مواد مغذی اضافی و فرار ار سیستم ایمنی را فراهم می کند(۱۱).

با توجه به اهمیت این باکتری در ایجاد عفونت های بیمارستانی و مقاومت آنها به آنتی بیوتیک ها و همین طور انتقال عرضی ژن های بیماریزایی در میان باکتری ها، تحقیق بر روی ژن های بیماریزا در آنتروکوکوس ها ضروری بنظر می رسد. هدف از این تحقیق بررسی حضور ژن های بیماریزای سایتولیزین در گونه های آنتروکوکوس جدا شده از نمونه های ادراری در تهران می باشد.

مواد و روش ها

از آزمایشگاه های تشخیص طبی در تهران در بهار و تابستان ۹۵ تعداد ۲۸۰ نمونه ادراری جمع آوری شد. نمونه ها مربوط به وسط جریان ادراری از ادرار افراد بیمار مراجعه کننده به آزمایشگاه به طریق استاندارد CLSI بدست آمده است.

نمونه ها بر روی محیط آگار خوندار کشت داده شده و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. از کلنی های یکنواخت بدست آمده، بر روی محیط کشت اختصاصی کانامایسین اسکولین آزید آگار منتقل گردیدند. بررسی ها ابتدایی بر روی کلنی های تیپیک با رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز انجام گردید (۱۲). همچنین برای بررسی تحمل نمک از محیط BHI broth+NaCl 6.5% استفاده گردید(۳).

برای تشخیص مولکولی نمونه ها در حد جنس آنتروکوکوس با استفاده از کیت تشخیصی آنتروکوک

ژنومات تایید مولکولی انجام گرفت. روش بیو شیمیایی برای تشخیص گونه *آنتروکوکوس فاسیوم* و*آنتروکوکوس فکالیس* استفاده از محیط مانیتول سالت آگار می باشد(۱۳, ۱۴). روش PCR برای بررسی حضور و تشخیص ژن سایتولیزین در آنتروکوکوس های تایید شده، بکار گرفته شد (۲). گونه استاندارد بکار گرفته شده ATCC 29212 به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت (۲).

جدول ۱- پرایمر های مورد استفاده برای ژن سیتولیزین

Gene	Primer sequence	Pcr product	Reference
Cyl f	TGGATGATAGTGATAGGAA GT	517bp	(2)
Cyl r	TCTACAGTAAATCTTCGTCA		(2)

جدول ۲- برنامه دمایی برای تشخیص مولکولی جنس آنتروکوکوس بر طبق کیت تشخیصی ژنومات

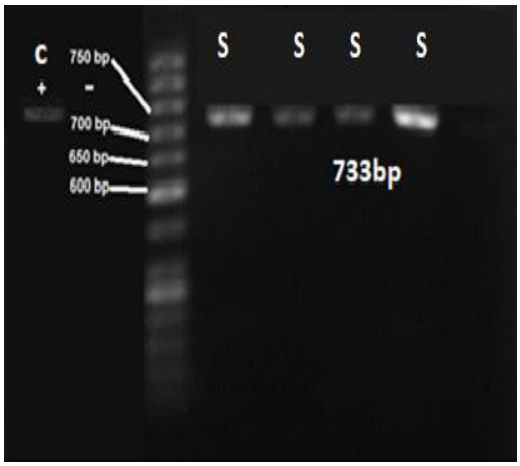
Level	Time	Temperature	Cycles
Initial denaturation	٤min	94 ^{0}c	١
Denature	١min	94 ^{0}c	٢٥
Annealing	١min	60 ^{0}c	٢٥
Extension	١min	72 ^{0}c	٢٥
Final Extension	١٠min	72 ^{0}c	١

جدول ۳- برنامه دمایی برای تشخیص ژن سیتولیزین توسط PCR

Level	Time	Temperature	Cycles
Initial denaturation	٢min	٩٤ °c	١
Denature	١٥ s	92 ^{0}c	٢٩
Annealing	١٥ s	^{0}c٥٦	٢٩
Extension	١٥ s	72 ^{0}c	٢٩
Final Extension	٢min	72 ^{0}c	١

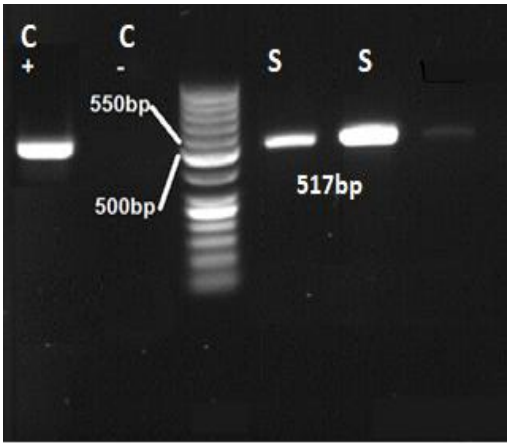
نتایج

در این پژوهش از ۲۸۰ نمونه ادراری جمع آوری شده از آزمایشگاه های تشخیص طبی در تهران، ۵۰ جدایه (۱۸٪) توسط روش مولکولی pcr توسط کیت مولکولی شرکت ژنومات بعنوان آنتروکوکوس شناسایی شدند (شکل ۳). سپس در سطح جنس در جدایه های شناسایی شده به روش مولکولی نشان داد که تمام جدایه ها (۱۰۰٪) متعلق به جنس آنتروکوکوس می باشند. بررسی در سطح گونه توسط روش بیوشیمیایی انجام گردید که همگی متعلق به *انتروکوکوس فکالیس* بود.

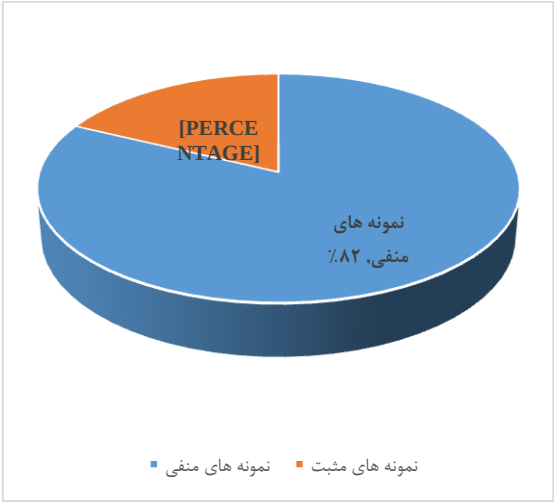


شکل ۱- بررسی حضور ژن اختصاصی جنس انتروکوکوس توسط کیت اختصاصی ژنومات

کنترل مثبت و منفی: C+, C-، نمونه ها=S.

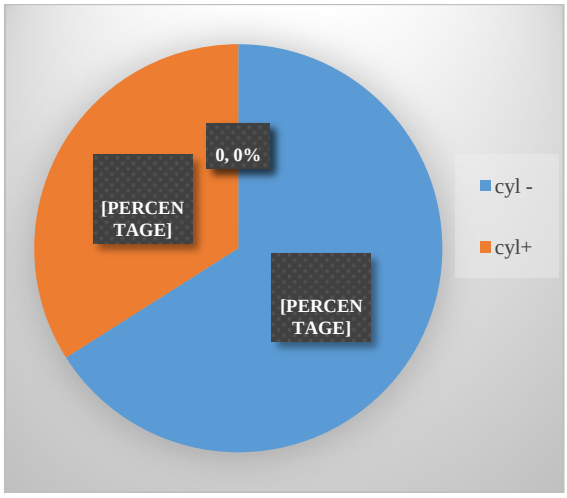


شکل ۲- بررسی حضور ژن سایتولیزین cyl (c: clinical sample)



شکل ۳- درصد حضور جدایه های آنتروکوکوس

تمام ۵۰ جدایه تایید شده از نظر وجود ژن سیتولیزین مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند که از بین آنها تعداد ۱۷ نمونه (۳۴٪) مثبت گزارش شدند (شکل ۴).



شکل ٤- درصد حضور ژن سایتولیزین (cyl) در جدایه های آنتروکوکوس

بحث

در این تحقیق از تعداد ۲۸۰ نمونه ادراری تعداد ۵۰ جدایه به عنوان آنتروکوکوس فکالیس شناسایی شد که از بین آنها تعداد ۱۷ جدایه (۳۴٪) دارای ژن سایتولیزین بودند.

در سال ۲۰۰۹، Ha¨llgren بر روی ژن های بیماریزا تحقیقاتی کرد. حضور ژن های بیماریزای asa، esp و cyl را بررسی کرد(۸). از ۱۱۵ نمونه بالینی بررسی شده این محقق 18%*انتروکوکوس فاسیوم* و82٪ *انتروکوکوس فکالیس* گزارش گردید. اتصال به کاتترهای ادراری به علت حضور ژن esp می باشد. آنها نشان دادند که تنها ژن ویرولانس در *انتروکوکوس فاسیوم* esp می باشد. آنها درصد حضور ژنهای ویرولانس esp، asa و cyl را در جدایه های *انتروکوکوس فکالیس* در مطالعه خود به ترتیب ۷۳٪، ۷۹٪ و ۱۳٪ گزارش نمودند. نتیجه گیری این است که *انتروکوکوس فکالیس* جداشده با مقاومت بالا نسبت به جنتامایسین مربوط به انتروکوکوس هایی است که ژن esp و asa را دارند.

در سال ۲۰۱۲ Rathnayake، مقاومت آنتی بیوتیکی و بیماریزایی در نمونه های بالینی و محیطی *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* مقایسه کرد. فاکتورهای ویرولانس اعم از esp، cylA، gelE، acm مورد بررسی قرار گرفتند. نسبت ژن های بیماریزایی جدایه های *انتروکوکوس فکالیس* پیداشده نسبت به میزان *انتروکوکوس فاسیوم*، افزایش نشان میدهد. جدایه های بالینی *انتروکوکوس فکالیس* درصد بالایی از ژن سایتولیزین cyl و esp در مقایسه با جدایه ها از آب را داراست. ۴۰٪ ژن سایتولیزین cyl در *انتروکوکوس فکالیس* و کمتر از ۱۰٪ *انتروکوکوس فاسیوم* می باشد.(۱۵).

Aslam و همکاران نشان دادند که ژن های بیماریزایی agg و cyl *انتروکوکوس فکالیس* بیشتر در ماکیان دیده می شود. ۵۰٪ جدایه های آنها دارای ژن سایتولیزین بودند. در مطالعه اخیر ۳۴ ٪ جدایه ها دارای ژن سایتولیزین بودند(۱۶).

در سال ۲۰۱۵، Santestevan و همکاران بر روی ژن های ویرولانس انتروکوکوس ها بررسی انجام دادند.

از مجموع ۴۳ فوک خزدار وحشی، ۱۱ مورد برای این تحقیق انتخاب شدند. آنها از لحاظ خصوصیات ژنوتیپی و فنوتیپی بررسی شدند و گونه های انتروکوکوس طبقه بندی شدند. بررسی حضور ژن ها بیماریزای ace، asa، gelE، cylA با روش pcr انجام گرفته است(۱۷). گزارش آنها شیوع ژن های ویرولانس (۶۸٪) aca، (۵۴٪) gelE، (۲۲ ٪) asa و (۴٪) cylA را نشان داد(۱۷). در حالیکه در تحقیق حاضر میزان حضورژن سایتولیزین ۳۴٪ بدست آمده است. دلایل تفاوت در نتایج، احتمالا بواسطه تنوع در نمونه های مورد بررسی، سطح بهداشت جوامع مورد مطالعه و چگونگی انتشار باکتری‌ها می باشد.

نتیجه گیری

نتایج نشان می دهد وجود آنتروکوکوس های بیماریزا در جامعه می تواند باعث کاهش سطح بهداشت گردیده و در نتیجه افزایش بروز بیماریها گردد. همچنین وجود ژنهای بیماریزا در این جدایه ها اهمیت توجه بیشتر به این موضوع را نشان می دهد

تشکر

مولفین بر خود لازم می دانند تا مراتب قدردانی و سپاسگزاری از خانم دکتر ابریشم چیان (آزمایشگاه تشخیص طبی مرکزی ولیعصر تهران) و آزمایشگاه نیک که در جمع آوری نمونه ها بسیار همکاری نمودند را اعلام نمایند.

منابع و مآخذ

1. Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. Emerging infectious diseases. 1998;4(2):239.
2. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Applied and environmental microbiology. 2001;67(4):1628-35.
3. Vu J, Carvalho J. Enterococcus: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. Frontiers in Biology. 2011;6(5):357-66.
4. Sava IG, Heikens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. Clinical microbiology and infection. 2010;16(6):533-40.
5. Henning C, Gautam D, Muriana P. Identification of multiple bacteriocins in Enterococcus spp. Using an enterococcus-specific bacteriocin pcr array. Microorganisms. 2015;3(1):1-16.
6. Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC, Bogie CP, Hall LR, Clewell DB. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD١-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. Journal of Bacteriology. 1994;176(23):7335-44.
7. Segarra R, Booth M, Morales D, Huycke M, Gilmore M. Molecular characterization of the Enterococcus faecalis cytolysin activator. Infection and immunity. 1991;59(4):1239-46.
8. Hällgren A, Claesson C, Saeedi B, Monstein H-J, Hanberger H, Nilsson LE. Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. International Journal of Medical Microbiology. 2009;299(5):323-32.
9. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. Microbiology. 2009;155(6):1749-57.
10. Clewell DB. Properties of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD١, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cytolysin. Plasmid. 2007;58(3):205-27.
11. Miyazaki S, Ohno A, Kobayashi I, Uji T, Yamaguchi K, Goto S. Cytotoxic effect of hemolytic culture supernatant from *Enterococcus faecalis* on mouse polymorphonuclear neutrophils and macrophages. Microbiology and immunology. 1993;37(4):265-70.
12. Gomes BC, Esteves CT, Palazzo IC, Darini ALC, Felis GE, Sechi LA, et al. Prevalence and characterization of Enterococcus spp. isolated from Brazilian foods. Food Microbiology. 2008;25(5):668-75.
13. Qamer S, Sandoe JA, Kerr KG. Use of colony morphology to distinguish different enterococcal strains and species in mixed culture from clinical specimens. Journal of clinical microbiology. 2003;41(6):2644-6.
14. Quiloan ML, Vu J, Carvalho J. *Enterococcus faecalis* can be distinguished from *Enterococcus faecium* via differential susceptibility to antibiotics and growth and fermentation characteristics on mannitol salt agar. Frontiers in Biology. 2012;7(2):167-77.
15. Rathnayake I, Hargreaves M, Huygens F. Antibiotic resistance and virulence traits in clinical and environmental *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. Systematic and applied microbiology. 2012;35(5):326-33.
16. Aslam M, Diarra MS, Checkley S, Bohaychuk V, Masson L. Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in Enterococcus spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada. International journal of food microbiology. 2012;156(3):222-30.
17. Santestevan NA, de Angelis Zvoboda D, Prichula J, Pereira RI, Wachholz GR, Cardoso LA, et al. Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of Enterococcus spp .isolates from wild Arctocephalus australis (South American fur seal) and Arctocephalus tropicalis (Subantarctic fur seal). World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2015;31(12):1935-46.