Antibiogram analysis and tracking of the virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* isolates

Bagheri Sheshdeh M[1], Nazarian-Firouzabadi F[2], Ismaili A[3], Akrami MJ[1]

1. MSc Student of Biotechnology, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.
2. Professor of Biotechnology, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran (Corresponding Author), Tel: +98-6633400191, E-mail: nazarian.f@lu.ac.ir
3. Associate Professor of Molecular Genetics, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

ABSTRACT

Background and Aim: *Enterococcus* species are opportunistic pathogens and their pathogenicity seems to be related to the presence of a number of pathogenicity genes. Since donkey's milk is a new non-allergenic source of nutrition, this study was performed to assess the antibiogram and detection of pathogenicity genes in some *Enterococcus faecalis* isolates from donkey's milk.

Materials and Method: In this experimental study, several *Enterococcus faecalis* isolates were isolated from donkey's milk. Resistance patterns of the isolates to 10 antibiotics including vancomycin were investigated based on CLSI protocol. Statistical comparison was made by Fisher's exact test. Polymerase chain reaction (PCR) amplification was used to study *gel* E, *esp*, *ace*, *as* and *efa*A pathogenicity related genes.

Results: *Enterococcus faecalis* isolates showed a different antibiogram pattern. Isolates were resistant to azithromycin, and erythromycin, but were susceptible to ampicillin and penicillin. Previously isolated LUB93929 and LUB93101 isolates were found to be susceptible and resistance to vancomycin, respectively. *Gel*E, ace and *efa*A genes were detected in both *Enterococcus faecalis* isolates and also in *Enterococcus faecalis* in the control strains. The aggregation substance gene (*as*) was only amplified in LUB93101 isolate. Interestingly, *esp* gene was not detected in any of the isolates.

Conclusion: Despite resistance to vancomycin and presence of some pathogenicity related genes in this study, *Enterococcus faecalis* isolates may not be human pathogens due to lack of pathogenic factors. The *esp* gene is crucial for biofilm formation and rise of nosocomial infections. Donkey's milk *Enterococcus faecalis* isolates are not able to form biofilm and seem not to bring any problem.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, Antibiogram, Pathogenicity genes, Donkey's milk

Received: Jan 6, 2019 Accepted: April 29, 2019

How to cite the article: Bagheri Sheshdeh M, Nazarian-Firouzabadi F, Ismaili A, Akrami MJ. Antibiogram analysis and tracking of the virulence-related genes in Enterococcus faecalis isolates. SJKU 2019;24(2):17-29.

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و چهارم / خرداد و تیر ۱۳۹۸/۲۹-۱۷

بررسی آنتی بیوگرام و ردیابی ژن‌های مرتبط بیماری‌زا در سویه‌های انتروکوکوس فکالیس

مهدی باقری ششده[۱]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۲]، احمد اسماعیلی[۳]، محمد جواد اکرمی[۱]

۱. دانشجوی کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

۲. استاد بیوتکنولوژی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران (مولف مسئول)، تلفن ثابت: ۶۳۳۴۰۰۰۱۲-۰۶۶، پست الکترونیک: nazarian.f@lu.ac.ir

۳. دانشیار ژنتیک مولکولی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: انتروکوکوس‌ها، پاتوژن‌های فرصت‌طلبی هستند که بیماری‌زایی آن‌ها ناشی از حضور چند ژن عامل بیماری‌زایی است. شیر الاغ منبع تغذیه‌ای جدید غیر آلرژیک برای انسان است؛ لذا بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تشخیص حضور برخی ژن‌های مهم و مؤثر در بیماری‌زایی انتروکوکوس فکالیس‌های جداسازی شده از آن ضرورت دارد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، تعدادی سویه انتروکوکوس فکالیس از شیر الاغ جمع‌آوری شد. الگوی مقاومت این سویه‌ها نسبت به ده آنتی‌بیوتیک از جمله ونکومایسین بر اساس پروتکل CLSI و با استفاده از آزمون فیشر مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. آزمون تکثیر ژن‌های بیماری‌زایی *gel*E، *esp*، *ace*، *as* و *efa*A به کمک PCR صورت گرفت.

یافته‌ها: سویه‌های انتروکوکوس فکالیس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و آزیترومایسین مقاوم و نسبت به آمپی‌سیلین و پنی‌سیلین حساس بودند. سویه‌های LUB93929 و LUB93101 جداسازی شده در مطالعه قبلی، به ترتیب نسبت به ونکومایسین حساس و مقاوم بودند. آزمون PCR نشان داد که هر دوسویه‌ی انتروکوکوس فکالیس به همراه سویه شاهد، دارای ژن‌های *gel*E، *efa*A و *ace* بودند. ژن *as* تنها در یک سویه حضور داشت. در نهایت در هیچ‌کدام از سویه‌ها ژن *esp* مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: علیرغم وجود برخی ژن‌های بیماری‌زا و مقاومت به ونکومایسین در برخی از سویه‌ها، به دلیل عدم وجود مجموع فاکتورهای بیماری‌زایی، سویه‌های انتروکوکوس فکالیس شیر الاغ احتمالاً بیماری‌زا نباشند. ژن *eps* در تشکیل بیوفیلم و اجتماع عفونت‌های بیمارستانی دخالت دارد، سویه‌های انتروکوکوس فکالیس شیر الاغ بیوفیلم تشکیل نمی‌دهند و از این‌رو به نظر می‌رسد که مشکل‌ساز نباشند.

کلید واژه ها: انتروکوکوس فکالیس، آنتی بیوگرام، ژن بیماری‌زایی، شیر الاغ

وصول مقاله: ۹۷/۱۰/۱۶ اصلاحیه نهایی: ۹۸/۲/۲ پذیرش:۹۸/۲/۹

مقدمه

انتروکوکوس‌ها(*Enterococcus*) باکتری‌هایی گرم مثبت و کاتالاز منفی هستند که به طور طبیعی در دستگاه گوارش پستانداران، خاک و آب یافت می‌شوند. در میان گونه‌های جنس انتروکوکوس، دو گونه انتروکوکوس فکالیس(*Enterococcus faecalis*) و انتروکوکوس فاسیوم(*Enterococcus faecium*) به‌عنوان پاتوژن‌هایی فرصت‌طلب و عامل افزایش درصد عفونت‌های باکتریومی داخل شکمی و عفونت‌های دستگاه ادراری شناخته شده هستند (۱). هر دو گونه نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله سفالوسپورین‌ها، لینکوزامیدها، پنی‌سیلین و سطوح پایین آمینوگلیکوزیدها از مقاومت ذاتی برخوردار هستند. افزایش سطوح مقاومت چند دارویی در گونه‌های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم به صورت تهدید بزرگی در بهداشت عمومی و از جمله ایران (۲) مطرح شده است که پیامد آن محدود شدن گزینه‌های درمانی است. هنگامی‌که مقاومت به آمپی‌سیلین وجود داشته باشد، درمان بالینی معمولاً شامل آنتی‌بیوتیک‌هایی چون لینوزئید و ونکومایسین است که بسیار گران‌تر و دارای عوارض جانبی بیشتری هستند. گونه‌های انتروکوکوس عفونت‌های بیمارستانی، در بسیاری از کشورها نگرانی‌هایی را ایجاد کرده‌اند. مطالعات جدید نشان می‌دهند که انتروکوکوس‌ها توانایی بسیار زیادی در تبادل مواد ژنتیکی، از جمله ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و ژن‌های بیماری‌زایی در بین خود و سایر پاتوژن‌ها از طریق پلاسمید و ترانسپوزون‌ها را دارند. بیماری‌زایی انتروکوکوس‌ها به خصوص انتروکوکوس فکالیس، تحت کنترل ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌هایی چون؛ آنزیم‌های پروتئولیتیک و سیتولیزین (ژلاتیناز و سرین پروتئاز)، چسبندگی (تجمع ماده، پروتئین سطحی انتروکوکوس (*esp*: enterococcal surface protein)، پروتئین چسبندگی کلاژن (ace: collagen-binding protein)، آنتی‌ژن A (*efa*A: E. faecalis Endocarditis Antigen A) و کپسول پلی ساکاریدی دیواره سلولی است (۶-۳). مشخصات ژن‌های بیماری‌زایی و ژل الکتروفورز در میدان ضربانی باکتری‌های انتروکوکوس فکالیس با منشأهای حیوانی، مواد غذایی و مدفوع انسان، با توجه به الگوهای مقاومت آن‌ها، بسیار شبیه به یکدیگر هستند، در نتیجه انتروکوکوس فکالیس با منشأ حیوانی خطر بالقوه‌ای برای انسان از نظر ریسک اپیدمی در جوامع انسانی محسوب می‌شوند (۷).

مواد لبنی، به ویژه شیر هنگامی که به صورت استریل مصرف نشوند، عامل انتقال گونه‌های انتروکوکوس بیماری‌زا از منشأ حیوانی هستند که در نهایت می‌توانند در دستگاه گوارش انسان باقی بمانند (۸). هجوم گونه‌های انتروکوکوس بیماری‌زای محصولات لبنی به دستگاه گوارش انسان در برخی از کشورها در سراسر جهان گزارش و مورد بررسی قرار گرفته است (۹). علاوه بر این، آلودگی شیر توسط انتروکوکوس‌ها از مبدأ مدفوع حیوان در طول فرآیند شیردوشی یا از منابع زیست محیطی (مانند تجهیزات دوشش یا آب آلوده) یک عامل مهم در آلودگی میکروبی محصولات لبنی است (۱۰). از طرف دیگر، گونه‌های انتروکوکوس، پاتوژن غالب در بیماری ورم پستان حیوانات شیرده هستند که سلامت پستان و کیفیت و سلامت شیر را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۱).

مطالعه میزان رخداد ژن‌های مرتبط به بیماری‌زایی در نمونه‌های انسانی و مواد لبنی در شمال ایتالیا نشان داد که هر دو گونه *Enterococcus faecalis* و *Enterococcus faecium* دارای ژن‌های بیماری‌زای مشترکی هستند، اما نحوه مقاومت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌هایرایج متفاوت است (۱۲). در مطالعه دیگری

که در برزیل روی سلامت شیر بوفالو صورت گرفت، محققان نتیجه گرفتند که به دلیل وجود ژن‌ها و فاکتورهای بیماری‌زایی در گونه‌های جنس Enterococci، ریسک ایجاد بیماری در انسان محتمل است زیرا این قبیل میکروب-ها بسیار فرصت طلب هستند (۱۳).

علیرغم مزایای فراوان شیر الاغ همانند چربی کم، کازئین پایین، لیزوزیم فراوان، وجود مقادیر بالایی از اسیدهای چرب اشباع نشده، کلسترول اندک، وجود مقادیر متنابهی از ویتامین‌های گروه‌های A، B و C و از همه مهم‌تر شباهت کم‌نظیر آن به شیر انسان، هنوز تحقیق جامعی در خصوص فلور باکتریایی آن صورت نگرفته است. مطالعات در مورد ترکیبات غذایی و ارزش تغذیه‌ای شیر الاغ سابقه‌ای طولانی دارد (۱۴). در بیشتر این قبیل تحقیقات سعی شده است تا به بررسی خواصی چون اثرات ضدالتهابی ، ضد میکروبی، ضد سرطانی، ضد تصلب شرایین و در نهایت اثبات ارزش غذایی این نوع شیر پرداخته شود. مطالعات اندکی را می‌توان برشمرد که روی جنبه‌های بهداشتی و شناسایی عوامل بیماری‌زای موجود در این شیر در دنیا و بخصوص ایران متمرکزشده باشند. تمایل به استفاده از شیر الاغ در جهان به‌عنوان یک منبع غذایی جانشین نسبت به شیر گاو در حال افزایش است. در ایران عشایر با توجه به نوع معیشت آن‌ها به‌صورت روزانه در تماس با شیر الاغ و پاتوژن‌های احتمالی موجود در آن می‌باشند. با توجه به وجود پاتوژن‌های فرصت طلب از جمله انتروکوکوس‌ها، احتمال آلودگی و انتقال این پاتوژن‌ها در میان این قشر بسیار زیاد است، به خصوص آنکه امروزه بسیاری از مردم به مصرف لبنیات محلی روی آورده-اند. در ایران شیوع انتروکوکوس‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با استفاده از آزمون حساسیت در جدایه‌های حاصل از عفونت‌های انسانی بررسی شده است (۱۷-۱۵ ،۲)، اما تاکنون مطالعه‌ای نسبت به بررسی شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی انتروکوکوس‌ها و ژن‌های عامل بیماری‌زایی آن در شیر، به خصوص شیر الاغ صورت نگرفته است. این مطالعه با هدف بررسی ارتباط ژن‌های بیماری‌زایی سویه‌های انتروکوکوس فکالیس جداسازی شده از شیر الاغ و ارتباط آن‌ها با بروز مقاومت یا حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها صورت گرفت. اهمیت این مطالعه بیشتر به این خاطر است که اطلاع از سویه‌هایی میکروبی موجود در مواد غذایی، به درک بهتر محققان از رفتار میکروارگانیسم‌ها فرصت‌طلب در ایجاد اپیدمی و مخاطرات آتی به وسیله آن‌ها کمک می‌کند.

مواد و روش‌ها

شناسایی باکتری‌های انتروکوکوس

Akrami و همکاران تعداد ۳۳ کلونی باکتری اسید لاکتیک را بر اساس مطالعات استاندارد میکروبیولوژیکی همانند آزمون‌های گرم بر اساس روش کریستیان گرم، کاتالاز، توانایی رشد در دماهای C ° ۱۵ و C° ۴۲ و همچنین توانایی رشد در pH=۹/۶ و توانایی رشد در غلظت (w/v) ۶/۵ درصد کلرید سدیم شناسایی کردند (۱۸). با استفاده از آغازگرهای عمومی ۲۷F و ۱۴۹۲R (جدول ۱) ناحیه ۱۶S rRNA دوسویه‌ی انتخابی به شکل تصادفی تکثیر و تعیین توالی شد. بر اساس روش‌های بیوانفورماتیکی این دو سویه با انتروکوکوس فکالیس ۹۹ درصد شباهت نشان دادند. این دوسویه به نام‌های LUB93101 و LUB93929 نام‌گذاری شدند و سپس توالی آن‌ها به شماره‌های دسترسی بانک ژن KP298396 و KP298395 در پایگاه NCBI به ثبت رسیدند. از این دو سویه از انتروکوکوس فکالیس برای ادامه‌ی بقیه‌ی مطالعات در این تحقیق استفاده شد.

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ی ژنومی به روش کلروفرم: ایزوآمیل الکل صورت گرفت. مقدار ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری انتقال یافت و در rpm ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع روشناور دور ریخته شد و رسوب باکتری‌ها ۳ مرتبه به منظور

حل نمودن DNA در فاز مایع، با بافر تریس-ادتا-کلرید سدیم TEN (EDTA100mM, NaCl 150mM, Tris HCl 100mM) و هر بار در ۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شد. به رسوب‌های حاصل، بافری متشکل از ۲۰۰ میکرولیتر بافر TENو۴ mg/ml لیزوزیم اضافه شد تا ارتباطات بین پپتیدوگلیکان‌ها در دیواره باکتری‌ها شکسته شود و به دنبال آن انکوباسیون به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ صورت گرفت. سپس ۵۰ میکرو لیتر محلول ۸/۵ درصد سدیم دوسیل سولفات اضافه گردید تا مولکول‌های چربی و پروتئینی از مولکول‌های DNA جدا شوند و در ادامه انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۷۵ $^{\circ}C$ انجام گرفت. مقدار ۱۵۰میکرولیتر استات پتاسیم (مولار) ۵ M با pH=۵/۲ روی یخ به نمونه‌ها اضافه شد تا کمپلکس سدیم دوسیل سولفات -پروتئین‌ها و چربی‌ها به کمک ایزوامیل الکل از DNA جدا شوند. سپس نمونه‌ها ۲۰ دقیقه در ۴ $^{\circ}C$ نگهداری شدند. سپس سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰rpm انجام شد. مایع روشناور جدا شد و برای خالص-سازی DNA از پروتئین‌ها، از مخلوط فنل: کلروفرم: ایزوامیل الکل (۲۴:۲۵:۱) استفاده شد. به منظور رسوب‌دهی DNA، از ایزوپروپانول سرد استفاده شد. در آخر، برای شستشوی DNA، از اتانول ۷۰ درصد استفاده شد. رسوب‌های DNA در دمای آزمایشگاه خشک شدند و رسوب حاصل در ۵۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل حل شدند. غلظت DNA توسط روش اسپکتروفتومتری و هم‌چنین الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد مشخص گردید. میزان ۲۰ نانوگرم از DNA ژنومی در غلظت نهایی در واکنش PCR استفاده شد.

آزمون تعیین حساسیت (آنتی بیوگرام)

حساسیت سویه‌ها با روش انتشار در دیسک (Disk diffusion) آگار و بر اساس پروتکل CLSI مورد بررسی قرار گرفت (۱۹). گروه‌بندی میکروب‌ها به شکل حساس، نیمه حساس و مقاوم بر اساس جداول ارائه‌شده در دستورالعمل شرکت پادتن طب (www.padtanteb.ir) صورت گرفت. برای این منظور سوسپانسیون میکروبی از سویه‌های به‌دست‌آمده در محیط مولر براث تهیه شده و غلظت آن به ۰/۵ مک فارلند (۱/۵×۱۰^{۸} cfu/ml) رسانده شد. با استفاده از سواب استریل روی محیط مولر هینتون آگار کشت متراکم صورت گرفت و برخی از متداول‌ترین دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (شرکت پادتن طب) شامل ونکومایسین (۳۰ µg)، سیپروفوکساسین (۵ µg)، نیتروفورانتوئین (۱۰ µg)، اریترومایسین (۱۰ µg)، آزیترومایسین (۳۰ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، پنی‌سیلین (۱۰ µg)، سفوتاکسیم (۳۰ µg) و سفتریاکسون (۳۰ µg) با فاصله مناسب حداقل ۲/۵ سانتی‌متری بر اساس روش انتشار دیسک دیفیوژن روی محیط قرار داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت گرما گذاری صورت گرفت (نمودار ۱). قطر هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌ها بعد از خارج کردن از انکوباتور بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده‌ی دیسک‌ها اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که در آزمون تعیین حساسیت و شناسایی ژن‌های عامل بیماری‌زایی، از باکتری (*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 به‌عنوان شاهد (مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) استفاده شد.

شناسایی ژن‌های عامل بیماری‌زایی

ژن‌های عامل بیماری‌زایی ژلاتیناز (*gel*E)، پروتئین سطحی خارج سلولی(*esp*) چسبندگی کلاژن (*ace*) ، تجمع ماده (*as*) و آنتی‌ژن اندوکاردیت انتروکوکوس فکالیس (*efa*A) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آن‌ها (جدول ۱) توسط PCR تکثیر شدند.

جدول ۱: آغازگرهای PCR و شرایط واکنش. تمامی برنامه‌های PCR شامل: ۳۰ چرخه واسرشتگی در دمای $^{\circ}C$ ۹۴ به مدت ۱ دقیقه، اتصال به مدت ۱ دقیقه در دماهای اتصال مربوطه و گسترش در دمای $^{\circ}C$ ۷۲ در مدت‌زمان ۱ دقیقه صورت گرفته بودند

ژن	توالی آغازگر (′3→′5)	طول محصول PCR	دمای اتصال	منبع
ACE F	AAAGTAGAATTAGATCCACAC	۳۲۰	۵۶	(۳۵)
ACE R	TCTATCACATTCGGTTGCG			
*gel*E F	AGTTCATGTCTATTTTCTTCAC	۴۰۲	۵۶	(۳۶)
*gel*E R	CTTCATTATTTACACGTTTG			
*efa*A F	CGTGAGAAAGAAATGGAGGA	۴۹۹	۵۶	(۳۵)
*efa*A R	CTACTAACACGTCACGAATG			
AS F	CCAGTAATCAGTCCAGAAACAACC	۴۰۶	۵۴	(۳۵)
AS R	TAGCTTTTTTCATTCTTGTGTTTGTT			
esp46 F	TTACCAAGATGGTTCTGTAGGCAC	۹۳۲	۵۸	(۳۵)
esp47 R	CCAAGTATACTTAGCATCTTTTGG			

شناسایی مورفولوژیکی باکتری‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

به منظور اطمینان از شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی سویه-های این مطالعه، از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی استفاده شد. برای تثبیت باکتری‌ها از گلوتارالدئید (Glutaraldehyde) بر اساس روش گلورت و رید استفاده شد (۱۸). به طور کلی، روش کار به این ترتیب بود که ابتدا کشت یک شبه از باکتری تهیه شد. پس از سانتریفیوژ باکترها در rpm ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، مایع روشناور دور ریخته شد و رسوب باکتری‌ها نگهداری شد. مقدار ۵ میلی‌لیتر آب استریل به لوله‌های کشت اضافه شد و رسوب باکتری‌ها پس از حل شدن با دور rpm ۴۰۰۰ شستشو داده شدند. شستشو دو بار دیگر تکرار شد تا بقایای محیط کشت حذف شود. به رسوب باکتری مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول گلوتارآلدهید و بافر فسفات اضافه شد و رسوب کاملاً حل شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و سپس به مدت یک شب در دمای $^{\circ}C$ ۴ نگهداری شدند. یک روز بعد از سانتریفیوژ در rpm۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه، مایع روشناور دور ریخته شد و شستشو با اتانول طی هشت مرحله انجام شد (۱۸). پس از آخرین مرحله‌ی شستشو، رسوب باکتری به مدت ۳-۲ ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ قرار داده شد تا کاملاً خشک شود. پس از تثبیت باکترها، مراحل آماده‌سازی باکتری برای میکروسکوپ الکترونی انجام شد. برای این کار از دستگاه (Denton Desk sputter coater-DSR1 Vacuum LLC, USA) با پوشش نانو ساختار طلا استفاده شد. پس از پوشش سطح سلول باکترها با ذرات طلا، از میکروسکوپ الکترونی (مدل FE SEM / Mira3 Lmu) با HV=۲۰ kV برای عکس‌برداری از سطح سلول باکتری استفاده شد.

روش آماری

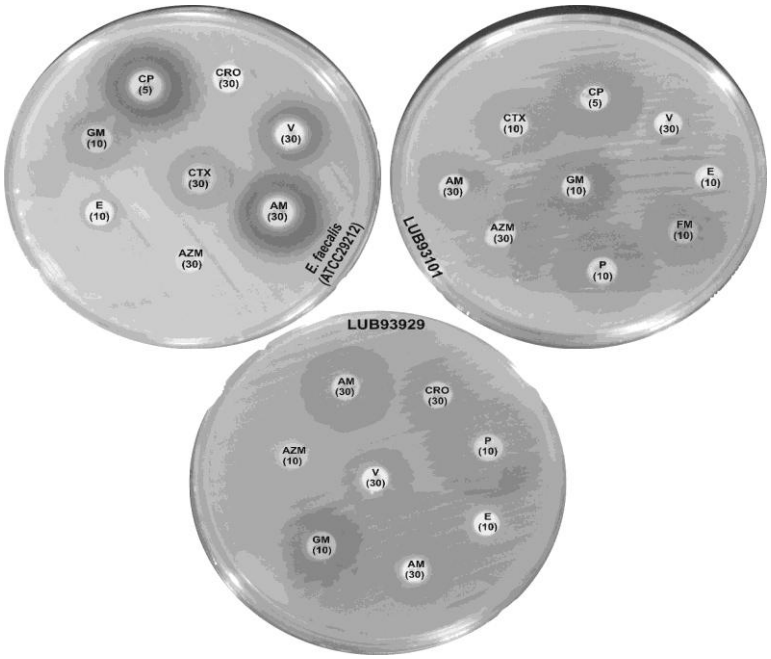
فراوانی رخداد ژن‌های بیماری‌زایی در بین دوسویه میکروبی *Enterococcus faecalis* توسط آزمون فیشر با

استفاده از نرم‌افزار SAS ver 9.1 برای هرکدام از ژن‌ها در سطح احتمال P< ۰/۰۵ مورد مقایسه قرار گرفت.

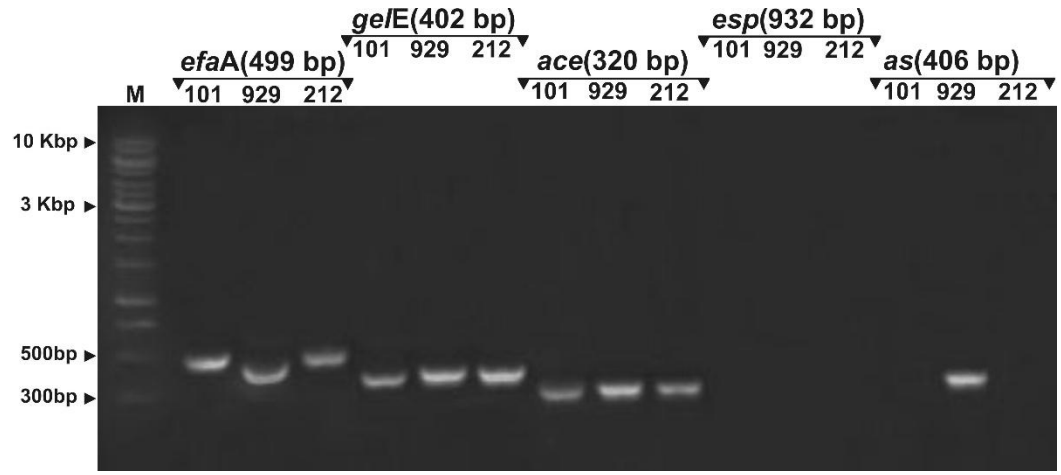
نتایج

نتایج حاصل از آزمون تعیین حساسیت سویه‌های انتروکوکوس فکالیس جداسازی شده از شیر الاغ نشان داد که هر دو سویه به طیفی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند. همان‌طوری که دیده می‌شود، هر دوسویه‌ی این مطالعه همانند گونه‌ی شاهد نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، آزیترومایسین و سفتریاکسون مقاوم هستند. بیشترین میزان حساسیت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های بتا لاکتام (پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین) بود که در این مورد دوسویه اختلاف معنی‌داری (P < ۰/۰۱) با هم نداشتند. از میان دوسویه‌ی مورد آزمایش سویه‌ی LUB93101 به ونکومایسین مقاوم و سویه LUB93929 همانند شاهد به ونکومایسین حساس بودند (شکل ۱). دو سویه از نظر سطح مقاومت یا حساسیت نسبت به سایر آنتی بیوتیک‌ها تفاوت-هایی را نشان دادند.

در آزمون شناسایی ژن‌های عامل بیماری‌زایی، هر دوسویه‌ی انتروکوکوس فکالیس جداسازی شده از شیر و گونه شاهد، همگی دارای ژن‌های *gel*E، *ace*، *efa*A بودند. تنها در سویه LUB93929 ژن *as* تکثیر شد و ژن *esp* در هیچ‌یک از نمونه‌ها یافت نشد (شکل ۲).

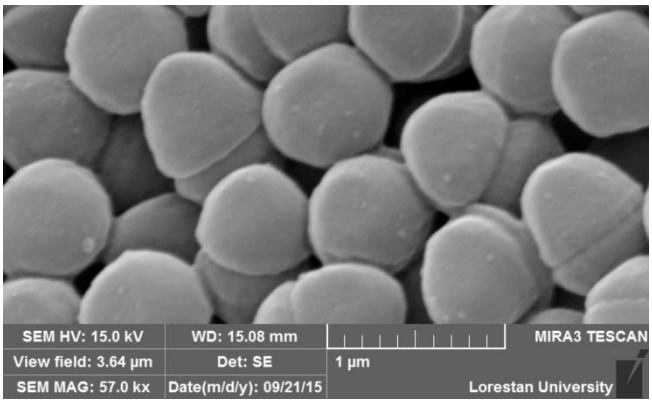


شکل ۱: نتایج حاصل از آزمون تعیین حساسیت باکتری‌های انتروکوکوس فکالیس حاصل از شیر الاغ. آمپی‌سیلین (AM)، نیتروفورانتوئین (FM)، اریترومایسین (E)، جنتامایسین (GM)، سیپروفوکساسین (CP)، سفوتاکسیم (CTX)، آزیترومایسین (AZM)، ونکومایسین (V)، پنی‌سیلین (P)، سفتریاکسون (CRO). از دستورالعمل شرکت سازنده‌ی دیسک‌ها برای تعیین مقاومت، مقاومت یا حساسیت حد واسط و حساسیت به آنتی‌بیوتیک استفاده شد. اعداد داخل پرانتز نشان‌دهنده‌ی میزان غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها بر حسب واحد میکروگرم هستند. از باکتری(*Enterococcus faecalis* ATCC29212) به‌عنوان شاهد استفاده شد



شکل ۲: تشخیص ژن‌های عامل بیماری‌زایی در سویه‌های انتروکوکوس فکالیس جداسازی شده از شیر الاغ سویه‌های LUB93101 (101) و LUB93101 (929). از سویه *Enterococcus faecalis* (212) به‌عنوان شاهد استفاده شد. اندازه محصول PCR هر ژن در داخل پرانتز ذکر شده است. M بیانگر مارکر Kb ۱ است

نتایج حاصل از تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی از هر دوسویه‌ی LUB شناسایی‌شده در این مطالعه نشان داده شده است (شکل ۳). با مقایسه این تصاویر با تصاویر باکتری‌های استرپتوکوکوس، شباهت زیادی مشاهده می‌شود. همان طور که مشاهده می‌شود، این باکتری‌ها کوکسی شکل و دوتایی هستند.



شکل ۳: تصویر باکتری‌های انتروکوکوس فکالیس سویه‌ها LUB93101 با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

بحث

از انتروکوکوس‌ها به‌عنوان سومین عامل عفونت مجاری ادراری در مراکز درمانی یاد می‌شود. اعضای این جنس به‌ویژه انتروکوکوس فاسیوم به طور ذاتی نسبت به بتالاکتام‌ها، سفالوسپورین‌ها، فلوروکینولون‌ها و آمینوگلیکوزیدها مقاوم هستند. گزارش‌های اولیه مربوط به پیدایش سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم مقاوم به ونکومایسین در اروپا و انتروکوکوس فکالیس در امریکا، هشداری جدی در خصوص بروز سویه‌های انتروکوکوس مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها به شمار می‌رود. امروزه درمان عفونت ناشی از چنین انتروکوکوس‌هایی نیاز به توجه و همکاری مشترک بین پزشک، میکروبیولوژیست،

بیوتکنولوژیست و سایر تخصص‌های کادر مراقبت بهداشتی دارد (۲۰). علیرغم آنکه بار میکروبی شیر الاغ به دلیل حجم بالای لیزوزیم (۳۷۵۰ mg/l در مقایسه با ۲۰۰ mg/l تا ۴۰۰ mg/l در شیر گاو و انسان) پایین است (۲۲)، اما به نظر می‌رسد که جنس‌هایی از باکتری‌های اسید لاکتیک در شیر الاغ وجود دارند که از نظر خواص پروبیوتیکی و همچنین بیماری‌زایی حائز اهمیت باشند. ترکیبی از پنی‌سیلین یا آمپی‌سیلین به علاوه یک آمینوگلیکوزید معمولاً برای عفونت‌های جدی با منشأ انتروکوک، مانند اندوکاردیت تجویز می‌شود. خوشبختانه نتایج حساسیت جدایه‌های مورد آزمایش نسبت به آمپی‌سیلین و پنی‌سیلین این امید را می‌دهد که در درمان عفونت‌های اندوکاردیت حاصل از انتروکوک‌ها می‌توان از این آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده نمود. تنها یک سویه از جدایه‌ها به ونکومایسین مقاومت نشان داد و سایر سویه‌ها همگی حساس بودند. از آنجایی که انتروکوکوس‌ها پاتوژن‌هایی فرصت‌طلب هستند، احتمال انتقال عامل مقاومت به ونکومایسین به سایر سویه‌ها نیز وجود دارد و این نکته سلامت میزبان‌های این پاتوژن را به خطر می‌اندازد. با این حال، میزان مقاومت به ونکومایسین در جدایه‌های حاصل از شیر الاغ بسیار کم بود و در مقایسه با اطلاعات مربوط به سویه‌های بیمارستانی و سایر سویه‌های جداسازی شده از منابع باکتری‌های اسید لاکتیک بسیار با ارزش است. Emaneini و همکاران نشان دادند که شیوع سویه‌های انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین در بیمارستان‌های تهران ۱۲ درصد بود (۲۳). در مطالعه Saderi و همکاران در بیمارستان شهید مصطفی خمینی تهران، انتروکوک‌ها با ۱۰/۵ درصد موارد مثبت بعد از اشرشیاکولی در مقام دوم قرار داشتند (۱۶). در مطالعه دیگری که توسط Amin و همکاران در بیمارستان امام خمینی اهواز انجام شد انتروکوک‌ها بعد از اشرشیاکولی، کلبسیلا، استافیلوکوک‌ها، انتروباکتر و سودوموناس در رتبه ششم قرار داشتند (۱۷). از آنجایی که انتروکوکوس‌ها مانند سایر باکتری‌های گرم مثبتی چون استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، استرپتوکوکوس پنومونیه (*Streptococcus pneumoniae*) و یا استرپتوکوکوس پیوژنز (*Streptococcus pyogenes*) جز عوامل بیماری‌زای بدخیم نیستند، مطالعه بیماری‌زایی آن‌ها نیز مشکل‌تر است. اگرچه تاکنون در هیچ مطالعه‌ای تأثیر مستقیم عامل‌های بیماری‌زایی انتروکوکوس‌ها را در عفونت‌های انسانی مشخص نکرده‌اند، اما تعدادی از این عوامل بیماری‌زا مورد مطالعه قرارگرفته و شرح داده شده‌اند (۲۴). ژلاتیناز یک متالوپروتئاز آب‌گریز با توانایی شکستن انسولین، کازئین، هموگلوبین، کلاژن، ژلاتین و فیبرین است (۶). مطالعاتی در تلاش برای برقراری ارتباط بین خواص پروتئولیتیک با حضور بالاتر از انتروکوکوس‌ها در اندوکاردیت و باکتریومی (۲۵)، عفونت ادراری (۲۶) و عفونت‌های دهان (۲۷) انجام شده است. با این حال، میکروارگانیسم ممکن است حتی در حضور ژن *gel*E، نتواند آنزیم ژلاتیناز را به دلیل حذف کروموزومی Kb ۲۳/۹ در جایگاه fsr بیان کنند (۲۸). این ژن در تمامی گونه‌های مورد آزمایش وجود داشت. Heidari و همکاران میزان فراوانی این ژن را در سویه‌های بیمارستانی انتروکوکوس فکالیس جداسازی شده از بیماران بیمارستان سوانح و سوختگی تهران را در حدود ۵۰ درصد برآورد کردند (۲۹). پروتئین سطحی انتروکوکوس توسط ژن *esp* رمزگذاری می‌شود. این احتمال وجود دارد که این پروتئین در استقرار و دوام انتروکوکوس فکالیس در طول عفونت نقش داشته باشند (۳۰)، همچنین ممکن است واسطه‌ای در واکنش اولیه پاتوژن با سطوح میزبان در طول تشکیل بیوفیلم باشند (۳۱). نتایج این مطالعه نشان داد که هیچ یک از دو سویه‌ی جداسازی شده از شیر الاغ همانند سویه‌ی شاهد *Enterococcus faecalis* ATCC29212 دارای ژن *esp* نبودند (نمودار ۲). این موضوع یافته‌ی جالب توجهی است، زیرا این پروتئین نسبتاً بزرگ(~202 KDa) در

تشکیل لایه بیوفیلم روی ادوات جراحی دخالت دارد (۳۲) بنابراین با وجود پتانسیل بیماری‌زایی این سویه‌های فرصت‌طلب ، شاید خطری جدی برای بیماران بستری در بیمارستان‌های کشور بخصوص استان لرستان محسوب نشوند. در تائید یافته‌های این تحقیق، در ۱۹ درصد از سویه-های انتروکوکوس بیمارستانی ژن *esp* مشاهده شد که نشان می‌دهد این سویه‌ها احتمالاً فرصت‌طلب باشند و در بروز بیماری نقش داشته باشند (۲۹). همچنین شیوع انتروکوکوس فکالیس در کانال ریشه تحت درمان دندان همراه با پریودنتیت آپیکال(Apical Periodontitis) بسیار متداول است (۳۲). این گونه به نظر می‌رسد که ژن‌ها و عوامل بیماری‌زایی شامل ژلاتیناز و پروتئین سطحی انتروکوکوس با حضور این گونه‌ها در کانال ریشه دندان‌هایی که پیش‌تر درمان شده‌اند و همچنین توانایی تشکیل بیوفیلم از جدایه‌های ریشه مرتبط باشد. از آنجای که سویه‌های این مطالعه فاقد ژن‌های لازم برای اتصال به سطح دندان هستند، ممکن است در بروز بیماری‌های مرتبط به کانال ریشه نقش نداشته باشند.

تا آنجا که اطلاعات ما نشان می‌دهد، این تحقیق برای اولین بار است که در ایران روی باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در شیر الاغ به‌عنوان منبع جدیدی از این باکتری‌ها متمرکز شده است. از انتروکوکوس فکالیس به‌عنوان یکی از باکتری‌های اسید لاکتیک فرصت طلب در مقاوم شدن به آنتی‌بیوتیک‌ها یاد می‌شود (۳۴، ۳۳). برای مثال؛ بررسی میزان مقاومت سویه‌های انتروکوکوس جداسازی شده از خط تولید پنیر محلی لیقوان در آذربایجان ایران نشان داد که این سویه ضمن برخورداری از مشخصات مطلوب پروبیوتیکی، نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک‌های رایج در ایران به جز ونکومایسین و تا حدودی آمپی‌سیلین مقاوم هستند (۳۷). همچنین مطالعه روی سویه‌های انتروکوکوس جداسازی شده از پنیرهای محلی جنوب ایتالیا نیز نتایج مشابه با مطالعه قبلی و همچنین یافته‌های این تحقیق را نشان می-دهد (۳۸). به علاوه همانند سویه‌های این مطالعه، در انتروکوکوس فکالیس‌ها جداسازی شده از پنیر برزیلی، ژن‌های *efa*A و *esp* وجود نداشتند، اما این سویه‌ها دارای ژن‌های بیماری‌زای *ace* و *gel*E بودند (۳۹). لذا با توجه به وجود برخی فاکتورهای بیماری‌زایی در باکتری‌های شیر الاغ، پیشنهاد می‌شود تا در صورت نیاز و مصرف شیر الاغ، این شیر حتماً به‌صورت پاستوریزه (تیمار حرارتی مناسب) مصرف شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که با وجود حضور برخی از ژن-های بیماری‌زایی و مقاومت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین در برخی از سویه‌های انتروکوکوس فکالیس شیر الاغ، به نظر می‌رسد که به دلیل عدم وجود مجموع فاکتورهای بیماری‌زایی در این سویه‌ها، احتمالاً سویه‌های انتروکوکوس فکالیس جداسازی شده از شیر الاغ در این مطالعه بیماری‌زا نباشند. عدم وجود ژن *esp* در سویه‌ها سویه‌های انتروکوکوس این مطالعه که در تشکیل بیوفیلم و اجتماع عفونت‌های بیمارستانی دخالت دارد، دلیل دیگری است که سویه‌های انتروکوکوس فکالیس شیر الاغ این مطالعه احتمالاً بیوفیلم تشکیل نمی‌دهند و از این‌رو به نظر می رسد که بیماری‌زا نبوده و از نظر بالینی مشکل‌ساز نباشند.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های این تحقیق از محل گرانت پژوهشی دانشگاه لرستان تأمین‌شده است. بدین‌وسیله از آقایان دکتر شیرخانی (آزمایشگاه تشخیص طبی دکتر شیرخانی) و دکتر رفیعی و همچنین سرکار خانم اعتمادی (آزمایشگاه تشخیص طبی مرکزی) برای مساعدت‌های بی‌دریغشان در انجام برخی آزمایش‌های میکروبی قدردانی می‌شود.

References

1. Conde-Estévez D, Grau S, Albanell J, Terradas R, Salvadó M, Knobel H. Clinical characteristics and outcomes of patients with vancomycin-susceptible Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium bacteraemia in cancer patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011;30:103-8.
2. Hoseinizadeh A, Abtahi H, Shoja Pour M, Akbari M, Nazari R, Sofian M. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of vancomycin resistant enterococci isolated from clinical sample of educational hospitals in Arak. J Arak Uni Med Sci 2012;15:11-6 . [In Persian]
3. Sava I, Heikens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. Clin Microbiol Infect 2010;16:533-40.
4. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of Enterococcus faecalis: relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med 2004;15:308-20.
5. Medeiros AW, Pereira RI, Oliveira DV, Martins PD, d'Azevedo PA, Van der Sand S, et al. Molecular detection of virulence factors among food and clinical Enterococcus faecalis strains in South Brazil. Braz J Microbiol 2014;45:327-32.
6. Waters C, Antiporta M, Murray B, Dunny G. Role of the Enterococcus faecalis gelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. J Bacteriol 2003;185:3613-23.
7. Larsen J, Schønheyder H, Singh K, Lester C, Olsen S, Porsbo L, et al. Porcine and human community reservoirs of *Enterococcus faecalis*, Denmark. Emerg Infect Dis 2011;17:2395-97.
8. Novais C, Coque T, Costa M, Sousa J, Baquero F, Peixe L. High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal. J Antimicrob Chemother 2005;56:1139-43.
9. Jamet E, Akary E, Poisson M, Chamba J, Bertrand X, Serror P. Prevalence and characterization of antibiotic resistant Enterococcus faecalis in French cheeses. Food Microbiol 2012;31:191-8.
10. Poznanski E, Cavazza A, Cappa F, Cocconcelli P. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. Int J Food Microbiol 2004;92:141-51.
11. Rysanek D, Zouharova M, Babak V. Monitoring major mastitis pathogens at the population level based on examination of bulk tank milk samples. J Dairy Res 2009;76:117-23.
12. Cariolato D, Andrighetto C, Lombardi A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium collected from dairy and human samples in North Italy. Food Control 2008;19:886-92.
13. Pereira RI, Prichula J, Santestevan NA, D'Azevedo PA, Motta AdSd, Frazzon APG. Virulence profiles in Enterococcus spp. isolated from raw buffalo's milk in south Brazil. Res J Microbiol Dubai 2017;12:248-54.
14. Guo H, Pang K, Zhang X, Zhao L, Chen S, Dong M, et al. Composition, physiochemical properties, nitrogen fraction distribution, and amino acid profile of donkey milk. J Dairy Sci 2007;90:1635-43.
15. Feizabadi M, Asadi S, Zohari M, Gharavi S, Etemadi G. Genetic characterization of high-level gentamicin-resistant strains of Enterococcus faecalis in Iran. Canadian J Microbiol 2004;50:869-72.

16. Saderi H, Owlia P, Jalali Nadoushan M, Zaeri F, Zandieh E. A 3-year study of demographic characteristics of patients with urinary tract infection, microbial etiology, and susceptibility of isolated bacteria to antibiotics in shaheed mostafa khomeini hospital. Iranian J Pathol 2006;1:99-104.
17. Amin M, Manijeh M, Zohreh P. Study of bacteria isolated from urinary tract infections and determination of their susceptibility to antibiotics. Jundishapur J Microbiol 2009;2009:118-23.
18. Akrami MJ, Nazarian-Firouzabadi F, Ismaili A, Bagheri sheshdeh M. Isolation and identification of probiotic lactic acid bacteria from donkey milk. Yafteh 2015;17:99-108. [In Persian]
19. Bonev B, Hooper J, Parisot J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. J Antimicrob Chemother 2008;61:1295-301.
20. Glauert AM, Reid N. Fixation, dehydration and embedding of biological sp ecimens: North-Holland Pub. Co. Sole distributors for the USA and Canada. American Elsevier Pub Co; 1974.
21. Murray B. Diversity among multidrug-resistant enterococci. Emerg Infect Dis 1998;4:37-47.
22. Carminati D, Tidona F, Fornasari M, Rossetti L, Meucci A, Giraffa G. Biotyping of cultivable lactic acid bacteria isolated from donkey milk. Letters Appl Microbiol 2014;59:299-305.
23. 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;57:173-8.
24. Jett B, Huycke M, Gilmore M. Virulence of enterococci. Clin Microbiol Rev 1994;7:462-78.
25. Baldassarri L, Creti R, Arciola C, Montanaro L, Venditti M, Di Rosa R. Analysis of virulence factors in cases of enterococcal endocarditis. Clin Microbiol Infect 2004;10:1006-8.
26. Nakayama J, Kariyama R, Kumon H. Description of a 23.9-kilobase chromosomal deletion containing a region encoding fsr genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of Enterococcus faecalis in urine. Appl Environ Microbiol 2002;68:3152-5.
27. Sedgley C, Lennan S, Clewell D. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. Oral Microbiol Immunol 2004;19:95-101.
28. Roberts J, Singh K, Okhuysen P, Murray B. Molecular epidemiology of the fsr locus and of gelatinase production among different subsets of *Enterococcus faecalis* isolates. J Clinical Microbiol 2004;42:2317-20.
29. Heidari H, Emaneini M, Dabiri H, Jabalameli F. Virulence factors, antimicrobial resistance pattern and molecular analysis of Enterococcal strains isolated from burn patients. Microb Pathog 2016;90:93-7.
30. Shankar N, Lockatell C, Baghdayan A, Drachenberg C, Gilmore M, Johnson D. Role of Enterococcus faecalis surface protein esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. Infect Immun 2001;69:4366-72.
31. Tendolkar P, Baghdayan A, Gilmore M, Shankar N. Enterococcal surface protein, esp, enhances biofilm formation by Enterococcus faecalis. Infect Immun 2004;72:6032-9.

32. Zoletti G, Siqueira J, Santos K. Identification of Enterococcus faecalis in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and independent approaches. J Endod 2006;32:722-6.
33. Bortolaia V, Espinosa-Gongora C, Guardabassi L. Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and Staphylococcus aureus on poultry meat. Clin Microbiol Infect 2016;22:130–40.
34. Christoffersen T, Jensen H, Kleiveland C, Dørum G, Jacobsen M, Lea T. In vitro comparison of commensal, probiotic and pathogenic strains of Enterococcus faecalis. Br J Nutr 2012;108:2043-53.
35. Creti R, Imperi M, Bertuccini L, Fabretti F, Orefici G, Di Rosa R, et al. Survey for virulence determinants among Enterococcus faecalis isolated from different sources. J Med Microbiol 2004;53:13-20.
36. Eaton T, Gasson M. Molecular Screening of Enterococcus Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. Appl Environ Microbiol 2001;67:1628-35.
37. Joghataei M, Yavarmanesh M, Dovom MRE. Safety evaluation and antibacterial activity of Enterococci isolated from lighvan cheese. J Food Safety 2017;37:e12289.
38. Aspri M, Bozoudi D, Tsaltas D, Hill C, Papademas P. Raw donkey milk as a source of Enterococcus diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. Food Control 2017;73:81-90.
39. Biscola V, Choiset Y, Rabesona H, Chobert JM, Haertlé T, Franco B. Brazilian artisanal ripened cheeses as sources of proteolytic lactic acid bacteria capable of reducing cow milk allergy. Jappl Microbiol 2018;125:564-74.