مقاله پژوهشی

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

نویسندگان:

سارا معصومی زواریانی[۱]، رضا میرنژاد*[۲]، شهره زارع کاریزی[۱]، وهاب پیرانفر[۳]، عذرا باقری بجستانی[۴]

۱- گروه میکروب‌شناسی، واحد ورامین – پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- مرکزتحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران
۳- گروه میکروب‌شناسی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاداسلامی، 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 انتروکوکی 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 بیماران بیمارستان‌های شهر تهران و بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها انجام گرفت.

روش کار: این مطالعه برروی ۴۰۰نمونه بالینی از بیمارستان‌های شهر تهران در طی سال‌های۹۴-۱۳۹۳ انجام شد.برای شناسایی انتروکوک از کشت‌های اختصاصی و تست های بیوشیمیایی برای شناسایی گونه‌های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم استفاده شد. روشPCR به‌منظور شناسایی گونه‌های انتروکوک به کار گرفته شد. حساسیت آنتی بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن کربی-بائر و معیار CLSIو اندازه گیری MICوانکومایسین به روش براث دلوشن انجام پذیرفت.

یافته‌ها: از ۴۰۰ نمونه جمع‌آوری‌شده،۲۷۸ نمونه انتروکوک تشخیص داده شد.بر اساس روش‌های فنوتیپی،۷۰/۸۶ ٪ سویه‌ها انتروکوکوس فکالیس و ۱۵/۴۶٪ انتروکوکوس فاسیومو ۱۳/۶۸٪ سایر گونه‌های انتروکوک بود.با استفاده از روش PCR،۷۲/۳٪ انتروکوکوس فکالیس،۱۰/۴۳٪ انتروکوکوس فاسیومو ۱۷/۲۷٪ سایر گونه‌های انتروکوک تشخیص داده شد.نتایج آنتی‌بیوگرام بیشترین مقاومت را به کوئین پریستین- دالفوپریستین۸۳/۳۴٪ و کمترین مقاومت را به لینزولاید۱/۴۱٪ نشان داد. همچنین مقاوم به وانکومایسین در ۹ مورد ۵/۹۵٪ باMIC≥۵۱۲µg/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، به‌منظور 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):52-59

مقدمه:

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

* نویسنده مسئول، نشانی: ، تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی
تلفن تماس: ۰۹۳۵۳۸۳۶۲۵۶ پست الکترونیک: rmirnejad@bmsu.ac.ir
دریافت: ۱۳۹۵/۲/۵ اصلاح: ۱۳۹۵/۵/۲۳ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۱۶

زنجیره‌های کوتاه دیده می‌شوند[۵]. این باکتری‌ها کاتالاز منفی، فاقد اسپور و بی‌هوازی اختیاری بوده که در نمک۶/۵٪ (کلرید سدیم)، نمک‌های صفراوی۴۰٪ و PH=۹/۶ رشد می‌کنند. انتروکوکوس‌ها در دمای۴۵-۱۰ درجه سلسیوس قابلیت رشد دارند[۶]. همچنین انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم می‌توانند دمای۶۰ درجه سلسیوس را به مدت ۳۰ دقیقه تحمل کنندکه این مورد وجه تمایز این دو گونه از سایر گونه‌های انتروکوک است[۸، ۷]. بیماری‌زایی انتروکوکوس‌ها در اواخر قرن نوزدهم توسط هاستینگ و مک کالوم گزارش شد [۸].

این باکتری‌ها در حال حاضر به‌عنوان عوامل عمده ایجادکننده عفونت، خصوصاً عفونت‌های بیمارستانی شناخته شده‌اند. امروزه اپیدمیولوژی عفونت انتروکوکی 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 پاتوژن های مهم بیمارستانی در نظر گرفته شوند. این باکتری‌ها به عنوان چهارمین عامل عفونت‌های بیمارستانی و سومین عامل عفونت‌های باکتریمی 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. انتروکوکوس ها به‌صورت ذاتی مقاومت حد واسط به سفالوسپورین ها، پنی سلین‌ها 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 [۱۳-۱۱]. ازاین‌رو، اهمیت تشخیص دقیق و سریع سویه‌های بیماری‌زای انتروکوکوس باعث پیشرفت روش‌های تشخیصی و ایجاد روش‌های تشخیص جدید می‌شود [۱۶-۱۴].

در گذشته به منظور تشخیص عفونت‌های انتروکوکی، 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 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 PCRمی‌توانند اطلاعات ارزشمندی در اختیار ما قرار دهند. این پژوهش با هدف شناسایی گونه‌های انتروکوکوس با استفاده از روش فنوتیپی و روش مولکولیPCR انجام شد. همچنین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌های ایزوله شده بررسی گردید.

روش کار:

جمع‌آوری نمونه‌ها

این پژوهش به صورت مقطعی – توصیفی روی۴۰۰ نمونه بالینی از ادرار، زخم، خون، مایع آسیت و ... مشکوک به عفونت با انتروکوکوس به‌صورت نمونه‌گیری تصادفی ساده از بیمارستان‌های بقیه ا...(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 خالص۲۴ ساعته، از نمونه‌های بالینی بر روی محیط Blood Agar، برای تمامی نمونه‌های کشت مثبت، رنگ‌آمیزی گرم، آزمون کاتالاز، هیدرولیز نمک‌های صفراوی (نمک‌های صفراوی 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 براث به نسبت یک درصد از قندهای ذکرشده و انکوبه کردن در دمای۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد. محیط فنل رد براث توسط اتوکلاو استریل شده و pH آن توسط NaOH استریل به ۷/۵-۷/۴ تنظیم شد. رنگ زرد محیط براث نشان‌دهنده مثبت بودن واکنش بود[۱۶].

آزمون آنتی بیوگرام نمونه‌های بالینی

با استفاده از دیسک‌های جنتامایسین 10µg، وانکومایسین 30µg، تیکوپلانین 30µg، لینزولاید 30µg، فسفومایسین 50µg و کوئین پریستین – دالفوپریستین 15µg تهیه‌شده از شرکت Mast به روش دیسک 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 به‌منظور تعیین MIC انتروکوک‌های مقاوم به وانکومایسین از روش Broth Dilution استفاده شد. در این مطالعه از سویه استاندارد انتروکوکوس فکالیسATCC 29212به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

شناسایی گونه انتروکوکوس با روش PCR

پس از استخراج ژنوم باکتری از نمونه‌های کشت مثبت با استفاده از روش جوشاندن، به‌منظور شناسایی گونه‌های انتروکوکوس از پرایمرهای اختصاصی گونه‌های(ddlE.faecalis و ddlE.faecium) استفاده شد[۱۷] (جدول ۱).

واکنش PCR با حجم نهایی۲۵میکرو لیتر شامل ۱میکرو لیتر DNA الگو(۰/۵ میکروگرم / میلی‌لیتر)، ۱میکرو لیتر از هر پرایمر (با غلظت ۱۰ پیکومول)، ۱۲میکرو لیتر2X Master mix (ساخت کمپانیAmpliqon IIIکشور دانمارک حاوی 20 mM dNTP، 1.5 mM MgCl2) و ۱۱میکرو لیتر آب دو بار تقطیر انجام شد.برنامه زمانی واکنش زنجیره پلی مراز در دستگاه ترموسایکلر (Humburg, Germany, Eppendorf) با شرایط دمایی دناتوراسیون اولیه به مدت یک دقیقه در دمای۹۴درجه 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 ۷۲درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه تنظیم شد. مرحله طویل‌سازی نهایی نیز در دمای۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه انجام شد. محصولPCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ حاویSafe Stain الکترفورز 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.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورداستفاده در تکثیر ژن ddlE.faecalis وddlE.faecium

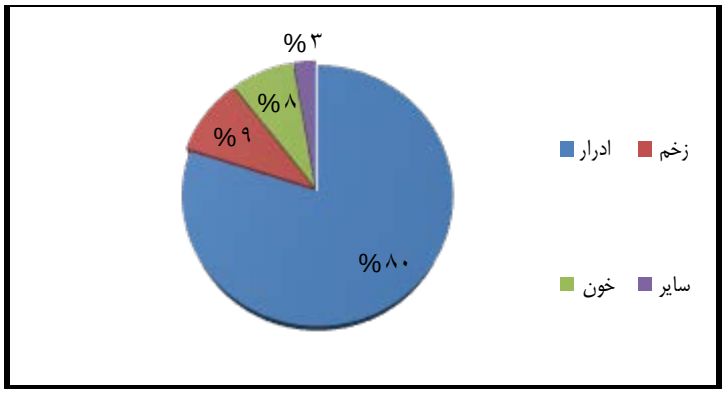
نام پرایمر	توالی(5′→ 3′)	اندازه قطعه	Refrence
ddlE.faecalis	F:ATCAAGTACAGTTAGTCT R:ACGATTCAAAGCTAACTG	941 bp	[17]
ddlE.faecium	F:TAGAGACATTGAATATGCC R:CTAACATCGTGTAAGCT	550 bp	[17]

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های جمع‌آوری‌شده توسط نرم‌افزار SPSS 16 با استفاده از آزمون فیشر و من- ویتینی در سطح اطمینان۹۵ درصد تحلیل شدند. مقدار P<۰/۰۵ به‌عنوان سطح معناداری آماری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

در این پژوهش، از ۴۰۰ نمونه بالینی ایزوله شده موجود، ۲۷۸ نمونه انتروکوکوس تشخیص داده شد که ۸۰٪ از نمونه‌های شناسایی‌شده 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 انتروکوک های جداسازی شده از نمونه‌های بالینی

تأییدگونه‌های انتروکوکوس توسط روش‌های فنوتیپی:

نتایج حاصل از تعیین گونه با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی نشان داد که از ۲۷۸ نمونه،جنس انتروکوک تشخیص داده شد که با استفاده از آزمون‌های اختصاصی ۱۹۷ مورد انتروکوکوس فکالیس(۷۰/۸۶٪)،۴۳مورد انتروکوکوس فاسیوم(۱۵/۴۶٪) و ۳۸ ایزوله سایر گونه‌های انتروکوکوس (۱۳/۶۸٪) تشخیص داده شدند. از ۲۰۸نمونه بیمارستان بقیه ا... (عج)،۱۳۷ (۶۵/۸۶٪) سویهانتروکوکوس فکالیس،۳۲ (۱۵/۳۸٪) سویهانتروکوکوس فاسیوم و از۷۰نمونه بیمارستان میلاد،۵۰ سویه(۷۱/۴۲٪) انتروکوکوس فکالیس و ۱۱ سویه(۱۵/۷۱٪) انتروکوکوس فاسیوم بودند.

نتایج آزمون مقاومت آنتی‌بیوتیکی:

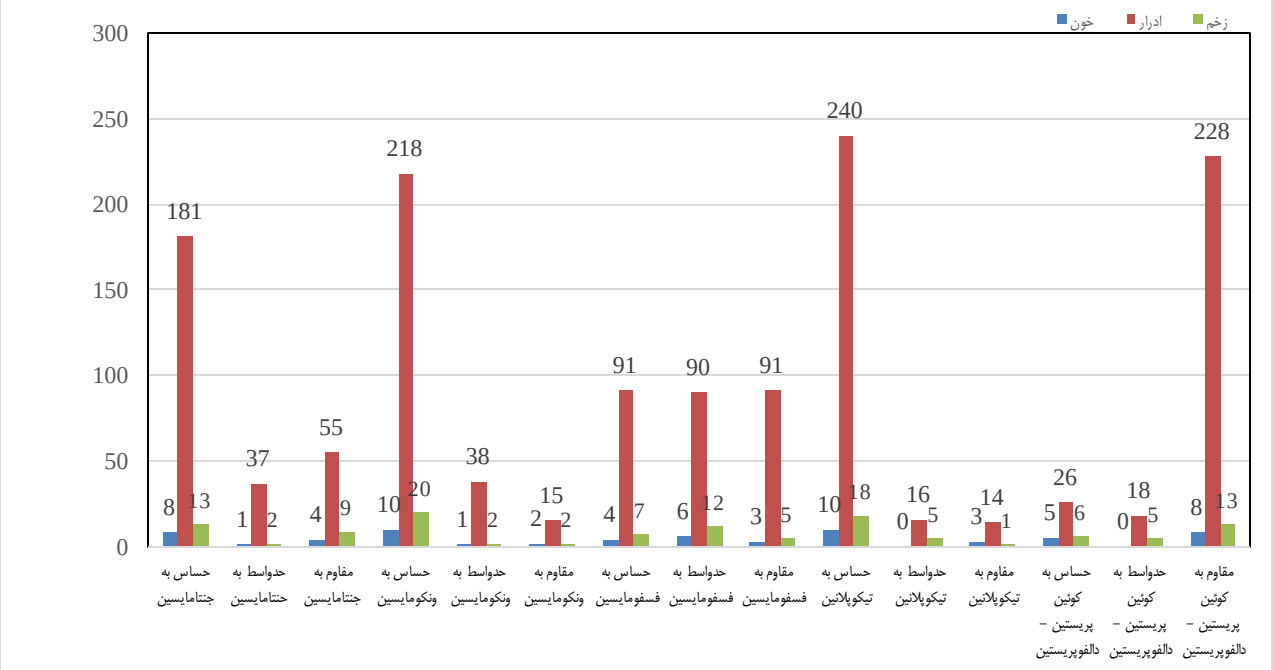
بر اساس تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، گونه‌های انتروکوکوس بیشترین مقاومت را به آنتی‌بیوتیک‌های کوئین پریستین – دالفوپریستین ۸۳/۳۴٪ و فسفومایسین ۳۷/۸۴٪ و کمترین مقاومت ۱/۴۱٪ را به لینزولاید نشان دادند (جدول ۲ و نمودار ۲).

سویه‌هایی که برای آنتی‌بیوتیک وانکومایسین دارای قطر هاله ۱۴≤ میلی‌متر بودند، برای تعیین MIC انتخاب شدند. ایزوله‌های موردبررسی که به‌خوبی در اطراف دیسک 30µg وانکومایسین رشد کرده بودند، مقاومت سطح بالایی در برابر وانکومایسین داشتند (MIC ≥ 512µg/mL). این نمونه‌ها شامل ۶ سویه انتروکوکوس فکالیس و ۳ سویه انتروکوکوس فاسیوم بودند.

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

جدول ۲: نتایج بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در انتروکوک ها

نام آنتی‌بیوتیک	مقاومت کل	بقیه ا... (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

تأییدگونه‌های انتروکوکوس با روش مولکولیPCR:

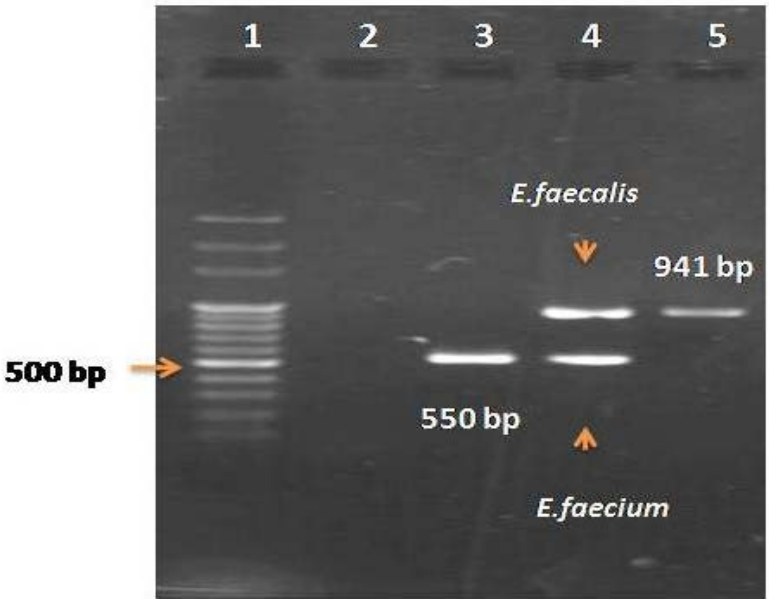
همچنین نتایج حاصل از PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی نشان داد (شکل ۱) که از ۲۷۸ نمونه ای که توسط آزمون‌های فنوتیپی جنس انتروکوک تشخیص داده‌شده بودند با استفاده از پرایمرهای اختصاصیانتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم، ۲۰۱ سویه انتروکوکوس فکالیس (۷۲/۳٪) و ۲۹ سویه انتروکوکوس فاسیوم (۱۰/۴۳٪) و ۴۹ سویه سایر گونه‌های انتروکوکوس (۱۷/۲۷٪) تشخیص داده شدند. از ۲۰۸ نمونه‌های بیمارستان بقیه ا... (عج)،۱۵۴(۷۰/۰۳٪) سویهانتروکوکوس 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 تشخیص 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 به‌صورت معناداری بیشتر از بیمارستان بقیه ا... (عج) بوده است (P<۰/۰۵).

نتایج تحلیل آماری آزمون فیشر با نرم‌افزار R، نشان داد که بر اساس منشأنمونه‌ها، در نمونه‌های ادرار مقاومت به کوئین پریستین –دالفوپریستین به‌طورمعناداری نسبت به مجموع تمام آنتی‌بیوتیک‌های دیگر شایع بود (P=0.048).در میان نمونه‌های زخم، بیشترین مقاومت به وانکومایسین و سپس جنتامایسین گزارش شد(P=0.007). در خون نیز مانند نمونه‌های به‌دست‌آمده از ادرار، کوئین پریستین – دالفوپریستین به‌طور معناداری شایع بود.

با تحلیل تمام الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی بدون در نظر گرفتن منشأ ایزوله‌ها، مشخص شد که بین مقاومت به وانکومایسین و مقاومت هم‌زمان نسبت به فسفومایسین (P=۰/۴۸۸)و تیکوپلانین (P=۰/۳۱۰) رابطه معناداری وجود ندارد.



شکل ۱: محصولات حاصل ازPCR چاهک ۱) مارکر (DNA 100bp). چاهک ۲) محصول تکثیرنیافته فاقد ژن از نمونه بالینی. چاهک ۳). محصول تکثیریافته ژن ddl E.faecium (550 bp) در نمونه بالینی موردبررسی چاهک ۴) محصول تکثیریافته هر دوژن چاهک ۵) محصول تکثیریافته ژن ddl E.faecalis (941 bp) در نمونه بالینی موردبررسی.

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

	گونه باکتری	فراوانی کل	فراوانی در بقیه ا...(عج)	فراوانی در میلاد
روش‌های فنوتیپی	انتروکوکوس فکالیس	٪۷۰/۸۶	٪۶۵/۶۸	٪۷۱/۴۲
	انتروکوکوس فاسیوم	٪۱۵/۴۶	٪۱۵/۳۸	٪۱۵/۷۱
	سایر گونه‌ها	٪۱۳/۶۸	٪۱۸/۹۴	٪۱۲/۸۷
روش‌های ژنوتیپی	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 مولکولی۷۲/۳٪ انتروکوکس 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 جداشده از شیر و پنیر انجام گرفت هم‌خوانی دارد [۲۲]. همچنین نتایج مشابه بامطالعه 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 انجام‌گرفته بودکه نتایج مشابه مطالعه حاضر است [۲۳]. مطابق نتایج به‌دست‌آمده، سویه‌های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم به ترتیب بالاترین درصد شیوع عفونت‌های انتروکوکی 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 PCRبه‌عنوان روشی سریع و آسان برای تشخیص سریع گونه‌ها به‌منظور جلوگیری از شیوع گسترده انتروکوک ها می‌توان استفاده کردد. 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 لبیب 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 فراوانیانتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم وجود دارد[۲۴]. همچنین در مطالعه لبیب و همکاران نشان داده شدکه 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 انجام‌شده، از سال ۲۰۱۱ افزایش شیوع و مقاومت آنتی‌بیوتیکی گزارش‌شده است. محمدی و همکاران در سال ۲۰۱۱ مطالعه‌ای را در کرمانشاه انجام دادند که از ۱۲۸ نمونه انتروکوکوس، ۵/۵ درصد آن‌ها مقاوم به وانکومایسین 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 وانکومایسین 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 وانکومایسین، 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, Sahm 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 Higuita 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:
URL 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 Entrococcus faecium and Entrococcus 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. Shokoohizadeh 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.

Original Article

Identification of Enterococci faecalis & E. faeacium pathogens viaTehran hospitals clinical samples by phenotypic and genotypic methods and Evaluation of Antimicrobial Susceptibility in 2015

Sara Masoumi Zavaryani[1], Reza Mirnejad*[2], Shohreh Zare Karizi[1]
Vahhab Piranfar[3], Ozra BagheriBejestani[4]

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):52-59

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. faeacium 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. faeacium and 13.68% other species. PCR identified 72.3% E. faecalis, 10.43% E. faeacium 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 ≥ 512 µg/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