دوره ۲۱، شماره ۶۶، تابستان ۱۳۹۷، صفحات: ۵۱-۴۱

مقاله پژوهشی

فراوانی ژن‌های *ebp A*، *ebp B* و *ebp C* در ایزوله‌های انتروکوکوس فکالیس تولیدکننده بیوفیلم جداشده از گوشت قرمز در شهرستان شهرکرد در سال ۱۳۹۶

پریسا مالکی[۱]، الهه تاج‌بخش[۲*]، ابراهیم رحیمی[۳]

[۱] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

[۲] دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، ایران

[۳] استاد، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۰۴ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۷/۰۶/۲۸

چکیده

مقدمه: انتروکوکوس به‌عنوان یک باکتری مقاوم به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی، قادر به انتشار ژن‌های مقاومت به سایر گونه‌ها می‌باشد. این باکتری به دلیل توانایی تشکیل بیوفیلم از قدرت بیماری‌زایی بالایی برخوردار است. در این ارتباط، پژوهش حاضر با هدف تعیین فراوانی انتروکوکوس فکالیس در گوشت گوساله عرضه‌شده به بازار مصرف شهرستان شهرکرد و بررسی ارتباط ژن‌های *ebp A*، *ebp B* و *ebp C* در ایزوله‌های انتروکوکوس فکالیس تولیدکننده بیوفیلم جداشده از گوشت قرمز صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی- مقطعی ۸۰ نمونه گوشت با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی از نظر وجود انتروکوکوس فکالیس مورد بررسی قرار گرفتند. ردیابی ژن‌های *ebp A*، *ebp B* و *ebp C* در حضور زوج پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت. تجزیه و تحلیل آماری نیز با استفاده از نرم‌افزار Prism 7 و آزمون دقیق Fisher انجام شد.

یافته‌ها: از میان ۸۰ نمونه گوشت گوساله مورد بررسی، براساس واکنش‌های بیوشیمیایی در ۳۱ ایزوله انتروکوکوس فکالیس تشخیص داده شد. در روش میکروتیتر پلیت به‌منظور تشکیل بیوفیلم در ۲۵ ایزوله (۸۰/۶۴ درصد) بیوفیلم تولید گردید. ژن *ebp A* در ۲۸ ایزوله (۹۰/۳۲ درصد) و ژن *ebp B* در ۱۰ ایزوله (۳۲/۲۵ درصد) گزارش گردید؛ اما ژن *ebp C* در هیچ‌کدام از ایزوله‌ها (۰ درصد) گزارش نشد.

نتیجه‌گیری: بیماری‌های منتقل‌شونده توسط غذا یکی از مشکلات شایع در بخش سلامت و بهداشت عمومی می‌باشند. در این میان، باکتری‌ها از جمله مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌ها و مسمومیت‌های غذایی محسوب می‌شوند برای جلوگیری از آلودگی میکروبی مواد غذایی، آموزش افراد، رعایت اصول بهداشتی و نظارت در آماده‌سازی، حمل و نقل، ذخیره‌سازی و عرضه مواد غذایی ضروری می‌باشد.

کلمات کلیدی: انتروکوکوس فکالیس، بیوفیلم، ژن‌های *ebp*، گوشت

* **نویسنده مسئول:** الهه تاج‌بخش، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، ایران. تلفن: ۰۹۱۳۱۸۴۱۰۱۲؛ ایمیل: ee_tajbakhsh@yahoo.com

مقدمه

امروزه با وجود پیشرفت تکنولوژی علوم و صنایع غذایی، بیماری‌های ناشی از غذا به‌عنوان مهم‌ترین مسأله در سراسر جهان مطرح می‌باشند. صدها میلیون انسان به بیماری‌های قابل انتقال از طریق غذا و آب مبتلا هستند. این مسأله در کشورهای درحال توسعه و در میان افرادی که به ضعف سیستم ایمنی مبتلا هستند، درحال افزایش می‌باشد. در دهه گذشته افزایش قابل توجه در گزارش افزایش بیماری‌های ناشی از غذاهای آلوده وجود داشته است. حفاظت از منابع غذایی دربرگیرنده ملاحظات در مورد کیفیت میکروبیولوژی و ایمنی از کالاهای موجود برای مصرف عموم می‌باشد؛ درحالی که این نگرانی‌ها اغلب به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا که بهداشت عمومی را به سرعت به خطر می‌اندازند، اختصاص دارد (۱).

انتروکوک عنصر مشترک جامعه میکروفلور پستانداران، پرندگان، حشرات و خزندگان است که به‌طور معمول در خاک، آب و بر روی گیاهان یافت می‌شود. انتروکوک‌ها اغلب از منابع زیست محیطی مانند آب، خاک، گیاهان کال و محصولات حیوانی جدا می‌شوند. استحکام ذاتی این باکتری‌ها به آن‌ها اجازه می‌دهد تا به راحتی در محیط زیست گسترش پیدا کنند. این باکتری در محیط‌های غنی از مواد غذایی، بدون اکسیژن و در برخی از موارد در مدفوع حیوانات میزبان مشاهده می‌شود. انتروکوک با عنوان "فلور طبیعی" به‌صورت کومنسال با انسان سازگار می‌باشد. در محیط بالینی، انتروکوک برای مدت طولانی روی سطوح باقی می‌ماند و در میان جمعیت بیماران و افرادی که در معرض ابتلا می‌باشند، به راحتی منتقل می‌شود. حضور انتروکوک در دستگاه گوارش حیوانات ممکن است منجر به آلودگی گوشت در زمان کشتار شود (۲،۳). انتروکوک‌ها، کوکسی‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی هستند که می‌توانند در حضور ۶/۵ درصد نمک و ۴۰ درصد املاح صفراوی رشد نمایند. شایع‌ترین انتروکوک‌های دخیل در عفونت‌های انسانی، انتروکوکوس فکالیس (۹۰-۸۵ درصد) و انتروکوکوس فاسیوم (۱۰-۵ درصد) هستند که منجر به ایجاد عفونت در مجاری ادراری، عفونت زخم و حتی اندوکاردیت می‌شوند. انتروکوکسی به‌طور معمول در دستگاه گوارش انسان و یا حیوانات ساکن است و عموماً از مدفوع انسان و انواعی از حیوانات جدا می‌شود. انتروکوکوس فکالیس سویه غالب از انتروکوکسی در دستگاه گوارش انسان است که بیشتر از سایر گونه‌ها مختص روده انسان بوده و اغلب منشأ مدفوعی دارد. برخی از سویه‌های انتروکوکوس فکالیس به‌طور معمول روی گیاهان وجود دارند؛ از این رو زمانی که در مواد غذایی یافت شوند، شاخص بهداشتی به شمار نمی‌روند. انتروکوکسی‌ها به‌صورت بسیار وسیع در طبیعت انتشار می‌یابند؛ به‌ویژه در کشتارگاه‌ها، اتاق‌های عمل‌آوری گوشت و محیطی که محصولات گوشت آماده‌سازی می‌شوند، وجود دارند (۷-۴). مطالعات نشان می‌دهند که انتروکوکوس فکالیس، بیوفیلم تشکیل می‌دهد و سیستم Quorum-sensing، کنترل‌کننده توسعه بیوفیلم در این باکتری می‌باشد.

بیوفیلم میکروبی، توده‌ای از باکتری است که در ابتدا با نیروی واندروالسی به‌طور ضعیفی به سطوح بی‌جان یا بافت زنده متصل می‌شوند و در مرحله بعد با تولید پلیمرهای خارج سلولی و ایجاد ساختار ماتریکس آلژینات موجب اتصال غیر قابل برگشت سلول‌ها به سطوح می‌گردند (۸،۹). توسعه بیوفیلم سبب مقاومت باکتری نسبت به درمان آنتی‌بیوتیکی شده و می‌تواند منجر به بروز مشکلات حاد در این زمینه گردد. باکتری‌های شرکت‌کننده در یک بیوفیلم بالغ می‌توانند غلظت‌های آنتی‌بیوتیک را ۱۰ تا ۱۰۰ برابر بیشتر از غلظت لازم برای کشتن باکتری‌های پلانکتونیک تحمل کنند؛ از این رو اتصال مؤثر انتروکوک‌ها بر سطوح

مختلف، یکی از عوامل مهم پاتوژنز عفونت‌های انتروکوکی محسوب می‌شود و توانایی انتروکوک برای تشکیل بیوفیلم، نگرانی بزرگی برای سلامت عمومی (نه‌تنها در بیماری‌های عفونی بلکه از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی) می‌باشد. ویرولانس این باکتری براساس دو ویژگی عمومی مشخص می‌شود: یکی توانایی اتصال به بافت‌ها و ایجاد بیوفیلم و دیگری مقاومت آنتی‌بیوتیکی. عوامل دخیل در اتصال و تشکیل بیوفیلم عبارت هستند از: پروتئین‌های سطحی، ژلاتیناز و پیلی مرتبط با اندوکاردیت و بیوفیلم (EBP: Endocardit and Biofilm Associated Pili). شایان ذکر است که لوکوس *ebp* منحصر به انتروکوک‌ها می‌باشد و در انتروکوکوس فکالیس، لوکوس *ebp* بسیار محافظت شده است (۱۰،۱۱).

مهم‌ترین ویژگی انتروکوک‌ها که به آن‌ها اجازه ایجاد بیماری می‌دهد، مقاومت غیرمعمول آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها است. برخی از انتروکوک‌ها نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مهم مقاوم هستند؛ درحالی که برخی دیگر نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌ها به‌جز گلیکوپپتید (ونکومایسین و تیکوپلانین) و ایمی‌پنم مقاوم می‌باشند. انتروکوکوس فاسیوم نسبت به انتروکوکوس فکالیس مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشتری دارد. هر دو انتروکوک حامل پلاسمیدهایی هستند که مقاومت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر تتراسایکلین، پنی‌سیلین، سفالوسپورین، ماکرولید، کلرامفنیکل و آمینوگلیکوزیدها را کد می‌کنند. انتروکوک‌ها به‌طور ذاتی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام تحمل دارند که این امر احتمالاً به دلیل پروتئین‌های متصل‌شونده به پنی‌سیلین (PBP_s) که تمایل کمتری نسبت به بیشتر داروهای بتالاکتام دارند، می‌باشد (۱۲،۱۳). در این ارتباط، در پژوهش حاضر علاوه بر تعیین فراوانی انتروکوکوس فکالیس در گوشت گوساله عرضه‌شده به بازار مصرف شهرکرد، تولید بیوفیلم توسط این باکتری، فراوانی ژن‌های *ebp A*، *ebp B* و *ebp C* و ارتباط آن‌ها با تولید بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

الف. نمونه‌گیری و جداسازی انتروکوکوس فکالیس

در این مطالعه مقطعی- توصیفی که در سال ۱۳۹۶ انجام شد، ۸۰ نمونه گوشت گوساله از ۱۰ مرکز عرضه گوشت (از هر مرکز ۸ نمونه) در شهرستان شهرکرد تهیه شد و در شرایط استریل و در مجاورت یخ به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید. سپس، ۵ گرم از هر نمونه گوشت توزین شد و با ۱۰ میلی‌لیتر بافر PBS مخلوط و یکنواخت گردید. در ادامه، ۳۰۰ میکرولیتر از محلول مورد نظر در یک پلیت حاوی محیط کانامایسین اسکولین آگار پخش شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. کلنی‌های رشدیافته در هر پلیت پس از سپری‌شدن مدت انکوباسیون از نظر رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، اکسیداز، رشد در حضور ۶/۵ درصد نمک و تخمیر قندهای آرابینوز، مانیتول، سوربیتول، لاکتوز و سوربوز تعیین هویت شدند (۱۴).

ب. آزمایش تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش میکروتیتر پلیت

برای بررسی قدرت اتصال باکتری انتروکوکوس فکالیس از روش میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده گردید. جنس میکروتیتر پلیت‌ها از پلی‌استیرن بود و هرکدام ۸ ردیف و ۱۲ ستون داشتند. شایان ذکر است باکتری‌هایی که توانایی اتصال به سطوح را داشته باشند، در انتها باقی مانده و به رنگ بنفش مشاهده می‌شوند؛ اما باکتری‌هایی که توانایی اتصال به سطوح را نداشته باشند، از سطح حذف می‌گردند. به‌منظور بررسی تشکیل بیوفیلم این باکتری، ابتدا یک لوپ

پر از کلنی باکتری به یک لوله حاوی محیط کشت تریپتیکاز سوی براث حاوی ۱ درصد گلوکز تلقیح شد. باید خاطرنشان ساخت که لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. سپس، کشت یک شبه باکتری با نسبت ۱/۱۰ رقیق گشته و ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی باکتری به داخل چاهک‌های میکروتیتر پلیت اضافه گردید. پس از تلقیح، در پلیت گذاشته شد و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. پس از گذشت این مدت، محتوای داخل چاهک‌ها خالی گردید و شستشوی چاهک‌ها سه مرتبه با فسفات بافر سالین انجام شد. سپس، پلیت‌ها در دمای اتاق خشک شدند و به مدت یک ساعت به‌منظور فیکس‌شدن در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در ادامه، هر چاهک به مدت ۱۵ دقیقه با ۲۰۰ میکرولیتر از کریستال ویوله ۰/۲ درصد رنگ گردید. سپس، چاهک‌ها به آرامی توسط فسفات بافر سالین شسته شدند. در ادامه، ۲۰۰ میکرولیتر اتیل الکل و استن به پلیت‌ها اضافه گردیدند و پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب نوری چاهک‌های رنگ‌شده با کریستال ویوله در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر (Elisa Reader) خوانده شد؛ به‌طوری که ایزوله‌های با OD مساوی و یا بالاتر از ۰/۲۱ به‌عنوان بیوفیلم قوی، ایزوله‌های دارای OD بین ۰/۱۰ تا ۰/۲۱ به‌عنوان بیوفیلم متوسط، ایزوله‌های با OD بین ۰/۱۰ تا ۰/۵۴ به‌عنوان بیوفیلم ضعیف و ایزوله‌های دارای OD کمتر از ۰/۵۴ به‌عنوان بیوفیلم منفی در نظر گرفته شدند. شایان ذکر است که جهت بررسی‌های مولکولی با استفاده از کیت استخراج DNA، DNA آن‌ها استخراج گردید (۱۵).

ج. آزمایشات مولکولی

از سوی دیگر، به‌منظور تأیید قطعی وجود انتروکوکوس فکالیس در نمونه‌های کشت‌داده‌شده و ردیابی ژن‌های *ebp A*، *ebp B* و *ebp C* در ایزوله‌ها از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. ابتدا DNA ژنومی باکتری‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن، ایران) مطابق با دستورالعمل کیت استخراج گردید. شایان ذکر است که به‌منظور ارزیابی کیفیت DNA استخراج‌شده از نمونه‌های مورد مطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز استفاده شد. برای این منظور ۵ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده روی ژل یک درصد آگاروز الکتروفورز گردید. برای کمیت‌سنجی DNA استخراج‌شده از دستگاه بایوفوتومتر استفاده شد و با اندازه‌گیری میزان DNA نمونه در طول موج نوری ۲۸۰ نانومتر، میزان DNA موجود در نمونه تعیین گردید. باید خاطرنشان ساخت نمونه‌های DNA که دارای کیفیت مناسب و کمیتی معادل ۵۰ نانوگرم بودند، برای مراحل بعدی و انجام آزمایش PCR (Polymerase Chain Reaction) انتخاب گردیدند (۱۶). به‌منظور بررسی حضور قطعی انتروکوکوس فکالیس در ایزوله‌ها، ردیابی ژن کدکننده 16srDNA واکنش PCR با استفاده از زوج پرایمرهای نشان‌داده‌شده در جدول ۱ صورت گرفت. در این مرحله واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۱۸/۰۵ میکرولیتر ddH_2O، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (سیناژن، ایران)، ۰/۷۵میکرولیتر $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر از هریک از زوج پرایمرهای R و F، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم DNATaq پلیمراز (سیناژن، ایران) و ۱ میکرولیتر از DNA هر نمونه انجام شد (۸). علاوه‌براین، به‌منظور ردیابی ژن‌های *ebp A*، *ebpB* و *ebpC* از زوج پرایمرهای ارائه‌شده در جدول ۱ استفاده گردید. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر برای ژن‌های *ebp A*، *ebpB* و *ebpC* صورت گرفت. برنامه حرارتی برای ژن‌های مورد بررسی در جدول ۱ نشان داده شده است (۱۷). ذکر این نکته ضرورت دارد که واکنش PCR در

جدول ۱: توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن 16srDNA و ژن‌های *ebp A*، *ebp B* و *ebp C* در ایزوله‌های انتروکوکوس فکالیس

ژن	توالی پرایمر	شماره بررسی	اندازه محصول (جفت باز)	برنامه PCR
16srDNA	RW015´-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3´ DJ745´-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3	CP022488.1	۳۷۰	یک سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه ۳۱ سیکل تکراری ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه ۵۹ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتی گراد، ۶۰ ثانیه یک سیکل ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه
Ebp A	AACTAACAAAAATGATTCGGCTCCAG CATCTCACGCATTTTATCTTCAACT	CP028285	۵۱۷	یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه ۳۲ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه ۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتی گراد، ۲ دقیقه یک سیکل ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه
Ebp B	CTGAAGGAAAAACGGTCCAA CTTTTGCGTCGTCAGTGTGT	CP022059	۱۰۰۳	یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه ۳۲ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه ۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتی گراد، ۲ دقیقه یک سیکل ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه
Ebp C	TGATAAATATCAAGGACTGGCAGA TAAGCATACTCTCCAGAAGTCACG	CP022059	۶۰۰	یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه ۳۲ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه ۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتی گراد، ۲ دقیقه یک سیکل ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه

دستگاه ترموسایکلر مستر سایکلر گرادیانت (اپندرف، آلمان) انجام شد. پس از انجام آزمایشات PCR، محصول PCR روی ژل ۱/۵ درصد آگارز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۱۲۰ ولت در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمنتاز، آلمان) الکتروفورز گردید و نتیجه به‌دست‌آمده توسط دستگاه تصویربردار از ژل (انگلستان، Uviteck) بررسی شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار

Prism 7 و آزمون دقیق Fisher صورت گرفت و P<۰/۰۰۵ به‌عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

نتایج

در پژوهش حاضر از مجموع ۸۰ نمونه مورد مطالعه، ۶۶ نمونه (۸۲/۵ درصد) آلوده به انتروکوک شناسایی شد که ۳۱ نمونه (۳۸/۷۵ درصد) آلوده به انتروکوکوس فکالیس بودند. در روش میکروتیتر پلیت به‌منظور تشکیل بیوفیلم، از ۳۱ ایزوله انتروکوکوس فکالیس در ۲۵ ایزوله (۸۰/۶۴ درصد) بیوفیلم تولید گردید که براساس OD در سه گروه قوی، ضعیف و منفی طبقه‌بندی شدند. در این پژوهش واکنش بیوفیلم قوی در ۱۵ ایزوله (۶۰ درصد)، بیوفیلم متوسط در ۷ ایزوله (۲۸ درصد) و بیوفیلم ضعیف در ۳ ایزوله (۱۲ درصد) گزارش گردید. در ۶ ایزوله نیز واکنش تولید بیوفیلم مشاهده نشد (جدول ۲).

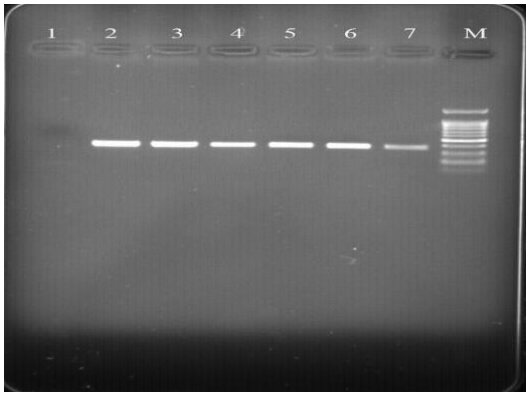
پس از استخراج DNA و بررسی کیفیت آن‌ها روی ژل آگارز ۱ درصد به‌منظور تشخیص قطعی باکتری انتروکوکوس فکالیس در حضور توالی ژن 16srDNA، باکتری‌های جداشده مورد بررسی قرار گرفتند و تمامی نمونه‌ها با داشتن باند ۳۷۰ جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند. نتایج مربوطه در شکل ۱ نشان داده شده‌اند.

پس از انجام آزمون PCR بر روی ۳۱ ایزوله انتروکوکوس فکالیس جداشده از گوشت قرمز، ژن *ebp A* در ۲۸ ایزوله (۹۰/۳۲ درصد) و ژن *ebp B* در ۱۰ ایزوله (۳۲/۲۵ درصد) گزارش گردید؛ اما ژن *ebp C* در هیچ‌کدام از ایزوله‌ها مشاهده نشد. از سوی دیگر در ایزوله‌هایی که بیوفیلم تولید می‌کردند، ژن *ebp A* در ۲۳ ایزوله (۸۲/۱۴ درصد) و در ایزوله‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم نبودند، این ژن در ۵ ایزوله (۱۷/۸۵ درصد) گزارش گردید. علاوه‌براین در ایزوله‌هایی که بیوفیلم تولید می‌کردند، ژن *ebp B* در ۸ ایزوله (۸۰ درصد) و در ایزوله‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم نبودند، این ژن در ۲ ایزوله (۲۰ درصد) گزارش شد (جدول ۳).

پس از انجام آزمون PCR بر روی ۳۱ ایزوله انتروکوکوس

جدول ۲: نتایج مربوط به آزمایش تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیترپلیت

باکتری	واکنش بیوفیلم					
	قوی		متوسط		ضعیف	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
انتروکوکوس فکالیس	۱۵	۶۰	۷	۲۸	۳	۱۲



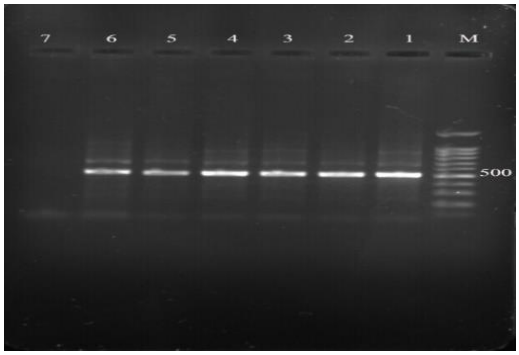
شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن 16srDNA انتروکوکوس فکالیس

ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز؛ ستون ۱: کنترل منفی؛ ستون‌های ۸-۳: نمونه‌های مثبت واجد باند ۳۷۰ جفت بازی

فکالیس جداشده از گوشت قرمز، ژن *ebp A* در ۲۸ ایزوله (۹۰/۳۲ درصد) و ژن *ebp B* در ۱۰ ایزوله (۳۲/۲۵ درصد) گزارش شد؛ اما ژن *ebp C* در هیچ‌یک از ایزوله‌ها مشاهده نشد. از سوی دیگر در ایزوله‌هایی که بیوفیلم تولید می‌کردند، ژن *ebp A* در ۲۳ ایزوله (۸۲/۱۴ درصد) و در ایزوله‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم نبودند، این ژن در ۵ ایزوله (۱۷/۸۵ درصد) گزارش گردید. علاوه‌براین در ایزوله‌هایی که بیوفیلم تولید می‌کردند، ژن *ebp B* در ۸ ایزوله (۸۰ درصد) و در ایزوله‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم نبودند، این ژن در ۲ ایزوله (۲۰ درصد) گزارش گردید. در تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون دقیق Fisher، بین تولید بیوفیلم و ژن *ebp A* با شاخص تکرارپذیری ۰/۰۰۲۰=(P<۰/۰۵) ارتباط معناداری به لحاظ آماری مشاهده گردید. نتایج در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده‌اند.

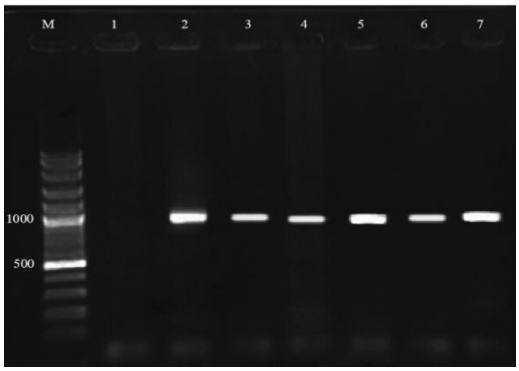
جدول ۳: فراوانی ژن‌های *ebpA*، *ebp B* و *ebp C* در ایزوله‌های انتروکوکوس فکالیس

ژن	بیوفیلم			
	+		−	
	N	درصد	N	درصد
Ebp A	۲۳	۸۲/۱۴	۵	۱۷/۸۵
ebp B	۸	۸۰	۲	۲۰
ebp C	۰	۰	۰	۰



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR ژن (*ebp A*)

ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز؛ ستون‌های ۶-۲: نمونه‌های مثبت واجد باند ۵۱۷ جفت بازی



شکل ۳: الکتروفورز محصولات PCR ژن *ebp B*

ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز؛ ستون ۱: کنترل منفی؛ ستون‌های ۲ و ۴: نمونه‌های مثبت واجد باند ۱۰۰۳ جفت بازی

بحث

بر مبنای مطالعات انجام‌شده، انتروکوک‌ها و کلی‌فرم‌ها به‌عنوان دو شاخص مهم بهداشتی مطرح هستند و تراکم بیش از حد مجاز آن‌ها در مواد غذایی، بیانگر وضعیت نامطلوب بهداشتی می‌باشد. آلودگی به انتروکوکوس در انواع مختلفی از مواد غذایی نظیر سبزیجات، گوشت، شیر و فرآورده‌های لبنی گزارش شده است (۱۷،۱۸). میزان شیوع انتروکوکوس در مواد غذایی بین ۵۲/۵ تا ۹۹ درصد گزارش شده است که به نوع ماده غذایی، فصل نمونه‌گیری و شرایط نگهداری بستگی دارد (۱۹). در پژوهش حاضر در مجموع ۸۰ نمونه گوشت گوساله مورد بررسی، آلودگی به انتروکوکوس فکالیس معادل ۳۸/۷۵ درصد گزارش گردید. در پژوهش انجام‌شده توسط Camargo و همکاران در برزیل، آلودگی به گونه‌های انتروکوکوس در نمونه‌های مواد غذایی معادل ۹۲/۵۰ درصد بیان شد که نسبت به نتایج حاصل از پژوهش حاضر بسیار بیشتر می‌باشد (۲۰). Barbosa و همکاران نیز در پژوهشی در شمال پرتقال، جداسازی ۱۸۲ ایزوله انتروکوک از فرآورده‌های گوشتی تخمیری سنتی را گزارش نمودند که آلودگی به انتروکوکوس معادل ۲۵/۵۵ درصد بود که نسبت به نتایج حاصل از پژوهش حاضر کمتر می‌باشد (۲۱). از سوی دیگر، مطالعات حاکی از آن هستند که سیستم Quorum-sensing کنترل‌کننده توسعه بیوفیلم در انتروکوکوس فکالیس می‌باشد. رشد باکتری‌های سطحی در هر محیطی که به لحاظ طبیعی، صنعتی و اکوسیستم مناسب باشد، منجر به تشکیل بیوفیلم می‌گردد. بیوفیلم میکروبی، توده‌ای از باکتری است که در ابتدا با نیروی واندروالسی به‌طور ضعیفی به سطوح بی‌جان یا بافت زنده متصل می‌شوند و در مرحله بعد با تولید پلیمرهای خارج سلولی و ایجاد ساختار ماتریکس آلژینات، موجب اتصال غیر قابل برگشت سلول‌ها به سطوح می‌گردند (۲۴-۲۲).

در پژوهش حاضر از ۳۱ ایزوله انتروکوکوس فکالیس، در ۲۵ ایزوله (۸۰/۶۴ درصد) بیوفیلم تولید شد که واکنش بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف به‌ترتیب ۶۰، ۲۸ و ۱۲ درصد گزارش گردید و در ۶ ایزوله واکنش تولید بیوفیلم مشاهده نشد. همچنین در پژوهش انجام‌شده توسط Barbosa و همکاران، واکنش بیوفیلم قوی و متوسط توسط انتروکوکوس فکالیس جداشده از مواد غذایی در شمال پرتقال به‌ترتیب معادل ۶۳/۲ و ۳۷/۵ درصد گزارش گردید که تقریباً با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مشابهت دارد (۲۱).

پروتئین *Ebp* یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های کدشده در پاتوژنیسیته انتروکوکوس فکالیس می‌باشد. در اوپرون *ebp* پروتئین *Ebp A* که در نوک پیلی قرار دارد، نقش اصلی روند پاتوژنیسیته را ایفا می‌کند. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که پروتئین *Ebp* به‌عنوان یک ادهزین در اتصال باکتری به پروتئین‌های فیبرینوژن و کلاژن که فرایندی بسیار مهم در مراحل اولیه عفونت می‌باشد، نقش دارد. علاوه‌براین، مشخص شده است که پروتئین *Ebp* برای تشکیل بیوفیلم از اهمیت بسیار زیادی برخوردار می‌باشد؛ به‌طوری که در مدل‌های تجربی موجب اندوکاردیت و عفونت دستگاه ادراری می‌شود (۲۵،۲۶).

در پژوهش حاضر فراوانی ژن‌های *ebp A* و *ebp B* در ایزوله‌هایی که بیوفیلم تولید می‌کردند به‌ترتیب ۸۲/۱۴ و ۸۰ درصد بود. در ایزوله‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم نبودند، ژن *ebp A* در ۵ ایزوله (۱۷/۸۵ درصد) و در ایزوله‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم نبودند، این ژن در ۲ ایزوله (۲۰ درصد) گزارش گردید. بر این مبنا بین تولید بیوفیلم و ژن *ebp A* ارتباط آماری معناداری وجود داشت. در این زمینه، در پژوهش انجام‌شده توسط طالبی و همکاران که در ارتباط با ۵۸ ایزوله انتروکوکوس فکالیس

جداشده از منابع محیطی و ۳۲ ایزوله انتروکوکوس فکالیس جداشده از دو بیمارستان در تهران صورت گرفت، توانایی تولید بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت بررسی گردید. در این پژوهش از ۵۸ ایزوله جداشده از نمونه‌های محیطی، ۳۶ ایزوله دارای بیوفیلم قوی، ۳ ایزوله دارای بیوفیلم ضعیف و ۱۶ ایزوله فاقد بیوفیلم بودند؛ اما در نمونه‌های بیمارستانی، ۲۳ ایزوله دارای بیوفیلم قوی، ۴ ایزوله دارای بیوفیلم ضعیف و ۵ ایزوله فاقد بیوفیلم بودند. فراوانی ژن‌های *ebp A*، *ebp B* و *ebp C* با استفاده از روش PCR بررسی گردید. در این پژوهش در نمونه‌های بیمارستانی ژن *ebp A* در ۵۰ ایزوله (۸۶ درصد)، ژن *ebp B* در ۵۵ ایزوله (۹۵ درصد) و ژن *ebp C* در ۵۶ ایزوله (۹۷ درصد) گزارش شد. در نمونه‌های محیطی نیز ژن *ebp A* در ۲۹ ایزوله (۹۱ درصد)، ژن *ebp B* در ۳۰ ایزوله (۹۴ درصد) و ژن *ebp C* در ۲۹ ایزوله (۹۱ درصد) به‌دست آمد (۸).

نتیجه‌گیری

باکتری‌ها مهم‌ترین عامل میکروبی بیماری‌های ناشی از مواد غذایی می‌باشند. بدیهی است که کنترل کیفی مواد غذایی و بررسی میزان آلودگی آن می‌بایست به‌طور مداوم و مستمر انجام شود. با توجه به استفاده روزافزون مردم از گوشت قرمز، خطر احتمالی مسمومیت غذایی و امکان آلودگی این محصول به عمده‌ترین باکتری‌های مولد مسمومیت غذای بالا می‌باشد. انتروکوک‌ها و کلی‌فرم‌ها به‌عنوان دو شاخص مهم بهداشتی مطرح هستند. بر مبنای اینکه حضور زیاد انتروکوک‌ها در مواد غذایی می‌تواند دلیلی بر آلودگی مدفوعی باشد و با توجه به نقش بسیار مهم آن‌ها در مسمومیت‌های غذایی، نتایج حاصل از این پژوهش نشان‌دهنده آلودگی نسبتاً زیاد گوشت قرمز عرضه‌شده در شهرستان شهرکرد که می‌تواند منجر به مسمومیت‌های غذایی در مصرف‌کنندگان گردد، می‌باشد.

حمایت مالی

پژوهش حاضر برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی بوده و با حمایت حوزه پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

نمونه‌ها از قصابی‌های سطح شهرستان شهرکرد تهیه شدند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافعی بین نویسندگان وجود ندارد و این مقاله با اطلاع و هماهنگی آن‌ها ارسال شده است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان از کارشناس محترم مرکز تحقیقات مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد؛ جناب آقای مهندس مؤمنی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Egli T, Köster W, Meile L. Pathogenic microbes in water and food: changes and challenges. FEMS Microbiol Rev. 2002; 26(2):111-2.
2. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. Science. 2005; 308(5728):1635-8.
3. Franz CM, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. *Enterococci* in foods a conundrum for food safety. Int J Food Microbiol. 2003; 888(2-3):105-22.
4. Giraffa G. *Enterococci* from foods. FEMS Microbiol Rev. 2002; 26(2):163-71.
5. Lebreton F, Willems RJ, Gilmore MS. *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut Colonization. Enterococci. 2014; 2:1-59.
6. Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Genetic

and biochemical study of *Enterococci* species isolated from Sewage Tehran with an emphasis on strains has gene *vanA* and *vanB*. Iran J Infect Dis Trop Med. 2008; 13(42):31-7. [in Persian]

7. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology. 2009; 155(6):1749-57.
8. Alipour M, Hajiesmaili R, Talebjannat M, Yahyapour Y. Identification and antimicrobial resistance of *Enterococcus spp*. isolated from the river and coastal waters in northern Iran. Sci World J. 2014; 2014:287458.
9. Talebi M, Asghari Moghadam N, Mamooii Z, Enayati M, Saifi M, Pourshafie MR. Antibiotic resistance and biofilm formation of *Enterococcus faecalis* in patient and environmental Samples. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8(10):e23349.
10. Nallapareddy SR, Sillanpää J, Mitchell J, Singh KV, Chowdhury SA, Weinstock GM, et al. Conservation of Ebp-type pilus genes among *Enterococci* and demonstration of their role in adherence of *Enterococcus faecalis* to human platelets. Infect Immun. 2011; 79(7):2911-20.
11. Nielsen HV, Flores-Mireles AL, Kaua AL, Kline KA, Pinkner JS, Neiers F, et al. Pilin and sortase residues critical for endocarditis and biofilm associated pilus biogenesis in *Enterococcus faecalis.* J Bacteriol. 2013; 195(19):4484-95.
12. Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A, Nalepa A, Laniewska A, TrokenheimL. Occurrence and antibiotic resistance of *enterococci* in ready to eat food of animal origin. Afr J of Microbiol Res. 2012; 6(39):6773-80.
13. Trivedi K, Cupakova S, Karpiskova R. Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. Veterinarni Med. 2011; 56(7):352-7.
14. Bakhshi Z, Bakhshi M. Practical diagnostic bacteria. 1st ed. Tehran: Jafari Publications; 2009. P. 82-3. [in Persian]
15. Gapeleh F, Mehrabi MR, Mirzaee M, Labibzadeh M. Biofilm formation and presence of *Esp* and *cylA* genes *Enterococcus faecalis* isolated from hospital infection. Clin Microbiol Case Reports. 2015; 4:2.
16. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. P. 58-152.
17. Gomes B, Esteves C, Palazzo I, Darini A, Felis G, Sechi L, et al. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. Food Microbiol. 2008; 25(5):668-75.
18. Hayes JR, English LL, Carter PJ, Proescholdt T, Lee KY, Wagner DD, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(12):7153-60.
19. Johnston LM, Jaykus LA. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce. Appl Environ Microbiol. 2004; 70(5):3133-7.
20. Camargo CH, Nascimento AB, Lee SH, Júnior AF, Kaneno K, Rall VM. Prevalence and phenotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated from food in Brazil. Braz J Microbiol. 2014; 45(1):111-5.
21. Barbosa J, Gibbs PA, Teixeira P. Virulence factors among *Enterococci* isolated from traditional fermented meat products produced in the north of Portugal. Food Control. 2010; 21(5):651-6.
22. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. Appl Environ Microbiol. 2001; 67(5):4538-45.
23. van Merode AE, van der Mei HC, Busscher HJ, Krom BP. Influence of culture heterogeneity in cell surface charge on adhesion and biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. J Bacteriol. 2006; 188(7):2421-6.
24. An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. J Biomed Mater Res. 1998; 43(3):338-48.
25. Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpaa J, Danielle A, Höök M, Erlandsen SL, et al. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. J Clin Invest. 2006; 116(10):2799-807.
26. Nielsen HV, Flores-Mireles AL, Kaua AL, Kline KA, Pinkner JS, Neiers F, et al. Pilin and sortase residues critical for endocarditis and biofilm associated pilus biogenesis in *Enterococcus faecalis.* J Bacteriol. 2013; 195(19):4484-95.

Volume 21, Issue 66, Summer 2018, Pages: 41-51

Original Article

Prevalence of *ebp-A*, *ebp-B* and *ebp-C* Genes in Biofilm-producing *Enterococcus faecalis* Isolated from Meat in Shahrekord, Iran

Parisa Maleki[1], Elahe Tajbakhsh[2*], Ebrahim Rahimi[3]

[1] MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[2] Associate Professor, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[3] Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received: 25 June 2018 **Accepted:** 19 September 2018

Abstract

Introduction: *Enterococcus*, as a bacterium resistant to most antibiotics, is capable of releasing resistant genes to other species. Due to its ability to form biofilms, it has high pathogenicity. The purpose of this study was to investigate the frequency of *Enterococcus faecalis* in beef meat sold in Shahrekord retail markets and to investigate the relationship between *ebp-A*, *ebp-B* and *ebp-C* genes in biofilm-producing *Enterococcus faecalis* isolated from meat.

Materials and Methods: In this descriptive cross-sectional study, 80 meat samples were examined by biochemical and molecular methods. Detection of *Enterococcus faecalis ebp-A*, *ebp-B* and *ebp-C* genes was performed in the presence of specific primers. Statistical analysis was performed using Prism7 software and Fisher's exact test.

Results: Of the 80 samples, meat samples were detected based on biochemical responses in 31 isolates of *Enterococcus faecalis*. Using the micro titer plate method, in 25 isolates (80.64%) biofilms were produced. *ebp-A* gene in 28 isolates (32.90%), *ebp-B* gene in 10 isolates (25.23%) and *ebp-C* gene in none of the isolates (0%) were not reported.

Conclusion: Foodborne diseases are one of the common problems in public health. Bacteria are the most important causes of infections and food poisoning. To prevent microbial contamination of foods, training individuals, observing health and supervision in the preparation, transportation, storage and delivery of foods are essential.

Keywords: Biofilm, *ebp* genes, *Enterococcus faecalis*, Meat

**** Corresponding Author:*** Elahe Tajbakhsh, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. Tel : 09131841012; Email: ee_tajbakhsh@yahoo.com