

Diagnostic Value of Melting Curve Analysis Based on Multiplex-Real Time PCR in Identification of Enterococci Species

Mohammad Reza Arabestani¹,
Hamed Tahmasebi²,
Behroz Zeyni³

¹ Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

² MSc in Microbiology, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

³ MSc Student in Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

(Received January 18, 2016 ; Accepted December 19, 2016)

Abstract

Background and purpose: *Enterococci* as a group of bacteria infecting raw foods and dairy products can contaminate different food products. The purpose of this study was to isolate strains of enterococci based on the Real time PCR method using melting curve analysis in food samples.

Materials and methods: In this experimental study, 510 samples were collected from which 138 different samples (chicken, meat, milk, and cheese) containing different strains of enterococci were investigated. Then, identification of *Enterococcus* species was performed by targeting specific sites and specific primers were designed according to Real time PCR-based melting curve analysis.

Results: Based on melting curve analysis by Real Time PCR, the *Enterococcus* species identified were as follows: *E.faecalis* in 84 isolates (60.86%), *E.faecium* in 48 (34.78%), *E.gallinarum* in 1 (0.7%), *E.avium* in 4 (2.8%), and *E.Caselli flavus* in 1 isolate (0.7%). The most frequent isolates were detected in 29 samples of chicken meat (51.44%) and red meat (n= 21, 24.63%). Considering the results of sequencing as a Gold a standard test, the sensitivity and specificity of phenotypic methods for *E.faecalis*, *E.faecium*, *E.gallinarum*, *E.avium*, and *E.Caselli flavus* were 94.78% and 90.74%, 89.13 % and 97.77 %, 50% and 98.52%, 66.66% and 98.52%, and 50% and 98.56%, respectively. A significant relationship was observed between the sample and distribution of *Enterococcus* species ($P \leq 0.05$).

Conclusion: Due to extensive viability error in identification of *Enterococcus* species isolated from food by phenotypic methods, using a rapid and sensitive method is necessary.

Keywords: *Enterococcus*, Real-Time PCR, melting curve analysis

تعیین ارزش تشخیصی روش آنالیز منحنی ذوب مبتنی بر Multiplex Real time برای شناسایی گونه های انتروکوکوس

محمد رضا عربستانی^۱

حامد طهماسبی^۲

بهر روز زینی^۳

چکیده

سابقه و هدف: انتروکوکوس ها می توانند سبب آلوده شدن فرآورده ای غذایی شوند. هدف از این پژوهش، جداسازی گونه های مختلف انتروکوکوس بر اساس روش Melting Curve Analyzing مبتنی بر Real time PCR در نمونه های مواد غذایی می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، ۱۳۸ نمونه مختلف (گوشت مرغ، گوشت قرمز، شیر، پنیر) آلوده به گونه های مختلف انتروکوکوس از مجموع ۵۱۰ نمونه مورد بررسی از سطح شهر جمع آوری شد. شناسایی گونه های مختلف انتروکوکوس با هدف قرار دادن سایت های انحصاری در گونه های مختلف و طراحی پرایمرهای اختصاصی برای این نواحی بر اساس روش Melting Curve Analyzing مبتنی بر Real time PCR صورت گرفت.

یافته ها: بر اساس آنالیز منحنی های ذوب به روش Real Time PCR، ۸۴ ایزوله (۶۰/۸۶ درصد) انتروکوکوس فکاليس، ۴۸ ایزوله (۳۴/۷۸ درصد) انتروکوکوس فاسیوم، ۱ ایزوله (۰/۷ درصد) انتروکوکوس گالیناروم، ۴ ایزوله (۲/۸ درصد) انتروکوکوس آویوم و ۱ ایزوله (۰/۷ درصد) به عنوان انتروکوکوس کاسلی فلاووس شناسایی شدند. بیشترین فراوانی ایزوله های انتروکوکوس به دست آمده مربوط به نمونه های گوشت مرغ با ۲۹ نمونه (۲۴/۶۳ درصد) و گوشت قرمز با ۲۱ نمونه (۵۱/۴۴ درصد) بود. هم چنین با قرار دادن نتایج حاصل از تعیین توالی آزمون PCR به عنوان شاخص استاندارد، حساسیت و ویژگی روش فنوتیپی برای انتروکوکوس فکاليس به ترتیب ۹۴/۷۸ درصد و ۹۰/۷۴ درصد، برای انتروکوکوس فاسیوم ۸۹/۱۳ درصد و ۹۷/۷۷ درصد، برای انتروکوکوس گالیناروم ۵۰ درصد و ۹۸/۵۲ درصد، برای انتروکوکوس آویوم ۶۶/۶۶ درصد و ۹۸/۵۲ درصد و برای انتروکوکوس کاسلی فلاووس ۵۰ درصد و ۹۸/۵۶ درصد به دست آمد. ارتباط معنی داری بین نوع نمونه و پراکنش گونه های انتروکوکوس مشاهده شد ($p \leq 0/05$).

استنتاج: با توجه به گستردگی و خطاپذیر بودن روش های فنوتیپی در تعیین گونه انتروکوکوس ها، و حساسیت و ویژگی پایین این روش، استفاده از یک روش حساس و سریع الزامی است.

واژه های کلیدی: انتروکوکوس، Real-Time PCR، Curve Analyzing Melting

مقدمه

می سازد (۱). مصرف باقیمانده های مواد دارویی مانند آنتی بیوتیک ها توسط انسان از طریق زنجیره

غذاهای مختلف، امکان انتقال بسیاری از پاتوژن های مفید و مضر از جمله باکتری ها را به بدن انسان فراهم

E-mail: b.zeyni.umsha@gmail.com

مؤلف مسئول: بهروز زینی - همدان: دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی

۱. دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۲. کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۳. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۵/۳۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۰/۲۷

غذایی (به واسطه فرآورده‌های دامی و لبنی)، باعث بروز واکنش‌های خطرناک آلرژیک، تب‌های مواج و گاه طولانی، اسهال، گرفتگی ماهیچه‌های شکمی، اثرات مخرب بر متابولیسم مواد در دستگاه گوارش می‌شود (۱). امکان انتقال ژن‌های عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها از محصولات دامی به انسان وجود دارد، به این صورت که به واسطه زنجیره غذایی این عوامل، مقاومت به آنتی‌بیوتیک از فلور میکروبی دام به پاتوژن‌های انسانی منتقل می‌شود (۲). انتروکوکوس‌ها (*Enterococcus*) از جمله مهم‌ترین باکتری‌هایی هستند که با دارا بودن خصوصیات منحصر به فرد، توانایی حضور در مواد غذایی و آلوده کردن آن‌ها را دارند (۳). این گروه از باکتری‌ها با تنوع بالای خود در کنار استفاده در صنایع غذایی، می‌توانند موجب ایجاد بیماری‌های مختلفی در انسان و حیوانات شوند (۳). انتروکوکوس‌ها به عنوان یکی از فلورهای طبیعی در دستگاه گوارش انسان و حیوان، خاک، آب و مواد غذایی وجود دارند. از ویژگی‌های این گروه از باکتری‌ها می‌توان به رشد در ۱۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد در محیط‌هایی با غلظت نمکی بالا و در گستره وسیعی از PH اشاره کرد. به علاوه انتروکوکوس‌ها دارای توانایی اکتساب فاکتورهای مقاومت دارویی متعددی هستند که مشکلات جدی در کنترل و مراقبت بیماران مبتلا به عفونت‌های انتروکوکوسی ایجاد می‌نمایند (۴). این میکروارگانیسم‌ها سومین علت معمول باکتریایی کسب شده در بیمارستان‌ها هستند. از بیست گونه انتروکوکوسی که تا امروز شناسایی شده‌اند، انتروکوکوس فکالیس (*Enterococcus faecalis*) و انتروکوکوس فاسیوم (*Enterococcus faecium*) حدود ۹۰ درصد از سویه‌های جدا شده از مواد غذایی و لبنی را به خود اختصاص داده‌اند (۵، ۶). اگرچه انتروکوکوس فاسیوم، انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس دورانس (*Enterococcus durans*) از مدفوع انسان به فراوانی جدا شده است، اما این گونه‌ها در دام‌های اهلی مانند خوک، گاو و گوسفند کم‌تر دیده می‌شوند (۷). دلیل حضور این گروه از

باکتری‌ها در بیش‌تر محصولات غذایی تهیه شده از مواد خام (گوشت و شیر) و محصولات غذایی فرآوری شده (مانند کالباس، سوسیس)، مقاومت انتروکوکوس‌ها به درجه حرارت پاستوریزه شدن، سازش‌پذیری آن‌ها به سوبستراهای مختلف و شرایط متفاوت رشد (درجه حرارت بالا و پایین)، pH حداکثر و نمک می‌باشد (۸).

شیوع و فراوانی جنس انتروکوکوس و گونه‌های مرتبط با آن در کنار پراکندگی بالا، از نظر مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی هم دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد. توانایی انتروکوکوس‌ها در انتقال عوامل مقاومت آنتی‌بیوتیکی از طریق مواد غذایی و قدرت آلوده‌کنندگی بالای آن‌ها، تشخیص به موقع و دقیق این گروه از باکتری‌ها را مهم کرده است (۵). روش‌های معمول شناسایی گونه‌های باکتریایی آلوده‌کننده مواد غذایی، به خصوص انتروکوکوس‌ها، از سرعت نامناسب و ارزش اخباری غیرقابل اطمینانی بر خوردار هستند (۹). در بسیاری از موارد، تشخیص جنس و گونه‌های انتروکوکوس که وابسته به روش‌های مبتنی بر کشت و بیوشیمیایی است، به دلیل وقت‌گیر بودن و استفاده از چندین آزمون قندی متعدد در کنار هم، خطای انسانی را به شدت بالا می‌برد که می‌تواند نتایج نهایی را تحت تاثیر قرار دهد (۱۰).

شناسایی گونه‌های انتروکوکوس، زمانی اهمیت ویژه‌ای پیدا می‌کند که سویه‌های مختلفی که به طیف گسترده‌ای آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند، مد نظر باشند (۱۱). در برخی روش‌های مولکولی، با هدف قرار دادن ژن‌های اختصاصی در باکتری و طراحی پرایمر، می‌توان به تشخیص آن‌ها پرداخت. در انتروکوکوس فکالیس *divIVA* یک ژن اختصاصی می‌باشد که در تقسیمات سلولی و جداسازی کروموزوم نقش دارد (۱۲). ژن *Alanine racemase* هم در انتروکوکوس فاسیوم در بیوسنتر پپتید و گلیکان و تبادلات L و D الانین نقش مهمی دارد (۱۳). حضور *vanC-1* در انتروکوکوس گالیناروم (*Enterococcus*) مقاومت شیوع و فراوانی جنس انتروکوکوس و گونه‌های مرتبط با آن در کنار

پراکندگی بالا، از نظر مقاومت‌های آنتیبیوتیکی هم دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد. توانایی *انتروکوکوس‌ها* در انتقال عوامل مقاومت آنتی‌بیوتیکی از طریق مواد غذایی و قدرت آلوده‌کنندگی بالای آن‌ها، تشخیص به موقع و دقیق این گروه از باکتری‌ها را مهم کرده است (۵). روش‌های معمول شناسایی گونه‌های باکتریایی آلوده‌کننده مواد غذایی، به خصوص *انتروکوکوس‌ها*، از سرعت نامناسب و ارزش اخباری غیرقابل اطمینانی بر خوردار هستند (۹). در بسیاری از موارد، تشخیص جنس و گونه‌های *انتروکوکوک* که وابسته به روش‌های مبتنی بر کشت و بیوشیمیایی است، به دلیل وقت‌گیر بودن و استفاده از چندین آزمون قندی متعدد در کنار هم، خطای انسانی را به شدت بالا می‌برد که می‌تواند نتایج نهایی را تحت تاثیر قرار دهد (۱۰). شناسایی گونه‌های *انتروکوکوک*، زمانی اهمیت ویژه‌ای پیدا می‌کند که سویه‌های مختلفی که به طیف گسترده‌ای آنتیبیوتیک‌ها مقاوم هستند، مد نظر باشند (۱۱). در برخی روش‌های مولکولی، با هدف قرار دادن ژن‌های اختصاصی در باکتری و طراحی پرایمر، می‌توان به تشخیص آن‌ها پرداخت. در *انتروکوکوکوس فکالیس* *divIVA* یک ژن اختصاصی می‌باشد که در تقسیمات سلولی و جداسازی کروموزوم نقش دارد (۱۲). ژن *Alanine racemase* هم در *انتروکوکوکوس فاسیوم* در بیوسنتز پپتید و گلیکان و تبادلات L و D الانین نقش مهمی دارد (۱۳). حضور *vanC-1* در *انتروکوکوکوس گالیناروم* (*Enterococcus gallinarum*) مقاومت سطح پایین به ونکومایسن را سبب می‌شود. در گونه‌های *انتروکوکوکوس کاسلی فلاووس* (*Enterococcus casseliflavus*) و *آویوم* (*Enterococcus avium*) نیز ژن‌های *elongation factor Tu (tuf)* و *16S* دارای عملکردهای انحصاری در روند ترجمه می‌باشند (۱۰). برای شناسایی این ژن‌ها استفاده از روش‌های مولکولی مبتنی بر تکنیک‌های حساس، می‌تواند در امر شناسایی این گونه‌ها کمک‌کننده باشد. یکی از این روش‌ها آنالیز منحنی

ذوب یا *Melting Curve Analyzing* می‌باشد که در آن با استفاده از تکنیک *Real time PCR* و رنگ‌های فلورسانت، ذوب لحظه‌ای *DNA* را مورد ارزیابی قرار می‌دهند. در این تست، تشخیص دقیق بر مبنای رابطه بین دما و وسعت دناچوره شدن *DNA*، استوار شده است. دناچوره شدن *DNA* با افزایش دما، منحنی ذوب را که معمولاً به شکل سیگموئید است، مشخص می‌کند (۱۲). با طراحی پرایمرهای اختصاصی با حساسیت بالا در کنار استفاده از روش‌های مبتنی بر *Real-Time PCR*، می‌توان علاوه بر از بین بردن خطاهای احتمالی در تشخیص اولیه، با حذف مسیر کشت باکتری، زمان شناسایی آن را در بیمار به شدت کاهش داد (۶). دف از این مطالعه، طراحی روشی پایه ایی مبتنی بر آنالیز نمودارهای مربوط به ذوب *DNA* برای تشخیص سریع و دقیق *انتروکوکوکوس‌های* جدا شده از نمونه‌های مواد غذایی و گوشت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه از مواد غذایی

در این مطالعه تجربی، تعداد ۱۳۸ نمونه مواد غذایی شامل گوشت مرغ (۳۴ نمونه)، شیر (۱۹ نمونه)، گوشت قرمز (۷۱ نمونه) و پنیر (۱۴ نمونه) مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه‌های مواد غذایی در فاصله زمانی اسفند ماه ۱۳۹۲ لغایت مهر ۱۳۹۳ به صورت تصادفی (آسان و در دسترس)، با هماهنگی با کارشناسان مراکز بهداشت وابسته به معاونت غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی همدان و در بازدید از سطوح عرضه گروه‌های مختلف مواد غذایی مانند سوپرمارکت‌ها، قصابی‌ها و مراکز توزیع و عرضه شیر در مناطق تحت شهر همدان جمع‌آوری شد. معیار ورود در این مطالعه، مراکزی بودند که از وزارت بهداشت، مجوز فعالیت رسمی داشتند. معیار خروج مراکزی بودند که فاقد مجوز لازمه بودند. نمونه‌های اخذ شده با رعایت شرایط استریل به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان منتقل شد.

شناسایی و جداسازی گونه های مختلف انتروکوکوس بر اساس تست های فنوتیپی

با استفاده از روش های بیوشیمیایی، سوش های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم، انتروکوکوس آویوم (*Enterococcus gallinarum*) و انتروکوکوس گالیناروم (*Enterococcus avium*) جداسازی و تعیین هویت شدند. برای جداسازی انتروکوکوسها از محیط کشت اختصاصی کاناماسین اسکولین آزید آگار (kanamycin aesculin agar) (شرکت مرک، آلمان) به عنوان مناسبترین محیط کشت برای شناسایی استفاده شد (۱۳). برای تعیین هویت گونه های انتروکوکوس با استفاده از روش های استاندارد میکروشناسی، مورفولوژی کلنی، با استفاده از ویژگی های بیوشیمیایی متداول از جمله هیدرولیز اسکولین در حضور صفرا، رشد در حضور ۶/۵NaCl درصد، فعالیت پیرولیدونیل آریل آمیداز (Pyr) انجام شد. هم چنین از آزمون های مبتنی بر تخمیر قندها (آرابینوز، مانیتول، سوربیتول، سوربوز، لاکتوز) در لوله های حاوی محیط پایه قندی به نسبت ۱ درصد از قندهای ذکر شده و انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد (۱۴، ۱۵).

استخراج DNA ژنومی

جهت استخراج DNA ژنومی از روش جوشاندن استفاده شد. در این روش به طور کلی یک کلنی از هر سویه باکتری در ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS (Phosphate Bufferd Saline) استریل ورتکس شده به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. پس از سانتریفوژ نهایی، مایع رویی به عنوان DNA مورد استفاده قرار گرفت.

جهت کنترل کیفیت DNA به دست آمده، غلظت و چگالی نوری DNA تخلیص شده در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ ND-1000 (USA, BioRad) تعیین گردید (۱۳).

طراحی پرایمرهای اختصاصی برای گونه های مختلف انتروکوکوس

جهت طراحی پرایمرهای اختصاصی، سایت های هدف در گونه های مختلف انتروکوکوس مورد استفاده قرار گرفت. سایت های هدف انتخاب شده برای پرایمر انتروکوکوس گالیناروم ژن *vanC*، برای انتروکوکوس کاسلی فلاووس (*Enterococcus casseliflavus*) ژن *EF-TU*، برای انتروکوکوس فکالیس ژن *divIVA* و برای انتروکوکوس فاسیوم ژن *Alanine racemase* تعیین شد. پس از انتخاب سایت هدف جهت طراحی پرایمر بانک های اطلاعاتی مربوط به هر باکتری از سایت NCBI جستجو و تهیه گردید. جهت ارزیابی دمای *Anneling* و *Tm* پرایمرهای طراحی شده از نرم افزار *Oligo* و *Gene Runner* استفاده شد. بعد از طراحی پرایمرهای ذکر شده به منظور اطمینان از اختصاصی بودن عملکرد آنها، در بانک اطلاعاتی NCBI عمل *Blast* کردن با نمونه های انسانی، قارچی، ویروس ها و میکروارگانیسم های دیگر صورت پذیرفت (جدول شماره ۱).

تعیین توالی محصولات پرایمرهای طراحی شده جهت تعیین آزمون استاندارد به منظور مقایسه حساسیت و ویژگی روش های کشت و مولکولی و هم چنین

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده جهت شناسایی گونه های مختلف انتروکوکوس در مواد غذایی

| بakterی مورد مطالعه | ژن های مورد نظر | طول توالی | اندازه (bp) | رفرنس |
|-------------------------|---|---|-------------|------------|
| انتروکوکوس فکالیس | <i>F.divIVA</i> <i>R.divIVA</i> | F: ACGTGTCTCCATCAACGCT R: ACTGCTGTAIGTTIGTCCCGA | ۱۱۳ | این مطالعه |
| انتروکوکوس فاسیوم | <i>F.Alanine racemase</i> <i>R. Alanine racemase</i> | F: ATCCCTCTGGGCACGCAC R: ACATACACGCCAATCGTTTC | ۲۴۸ | این مطالعه |
| انتروکوکوس گالیناروم | <i>vanC-F</i> <i>vanC-R</i> | AGCAATAAAATCTTTGTGGGTTCTGT ATTTCGGGCAATGAAAGACAG | ۱۵۸ | این مطالعه |
| انتروکوکوس کاسلی فلاووس | <i>EF-tu-F</i> <i>EF-tu-R</i> | TTTTCGATCACAGGACGGGG GTTATCGCCAGCTTCTCCGA | ۱۷۱ | این مطالعه |
| انتروکوکوس آویوم | <i>16s-F</i> <i>16s-R</i> | GTTTCGGTTTGAAGGCGCT TGCTCAGTCCCAATGTGGC | ۱۳۸ | این مطالعه |

الکتروفورز محصولات حاصل از PCR

محصولات PCR توسط الکتروفورز با استفاده از ژل ۵٪ درصد آگارز از یکدیگر جدا شدند؛ به این صورت که ۵ میکرولیتر از محصول نهایی PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر ۰/۵X الکتروفورز گردید. برای رنگ دهی به ژل، به آن ۴ میکرولیتر محلول Gel Red (Biotium آمریکا) اضافه و خوب مخلوط گردید. برای تعیین اندازه محصولات از نشانگر (Marker) مولکولی فرمتاز (ThermoFisher دانمارک) با توالی ۱۰۰ جفت بازی استفاده شد. در نهایت از ژل حاصل توسط دستگاه ژل داک عکسبرداری شد.

شناسایی گونه‌های مختلف اتروکوکوس به واسطه
Real time PCR

جهت انجام واکنش Real time از دستگاه ABI one plus (آمریکا) استفاده شد. تنظیمات دمایی دستگاه به صورت زیر اعمال شد. مرحله اول که منجر به دناتوره شدن DNA الگو و فعال شدن آنزیم پلیمراز می‌گردد، در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. در مرحله دوم، واکنش تکثیری DNA در ۴۰ سیکل و با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه ادامه یافت. مرحله پایانی جهت ترسیم منحنی تفکیک یا منحنی ذوب به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. واکنش‌های Real time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به صورت دوتایی در پلیت‌های ۹۶ چاهکی انجام شدند. مخلوط واکنش شامل Mix Master PCR SYBR Green (TaKaRa, Japan) به میزان ۱۰ میکرولیتر، ۱ میکرولیتر (غلظت ۱۰ پیکومولار) از پرایمرهای مستقیم و معکوس، ۵ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرولیتر رنگ Rox و بقیه آن آب

اطمینان از عدم همولوژی و مکمل بودن توالی پرایمرها با توالی‌های نوکلئوتیدی در بخش‌های دیگر ژنوم، آزمون PCR جهت تکثیر ژن‌های هدف در گونه‌های مورد مطالعه تایید شده از نظر فوتویی انجام گرفت. محصولات به دست آمده برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شدند. در نهایت نتایج حاصل از تعیین توالی‌های طراحی شده در قسمت BLAST پایگاه NCBI tool Search BLAST به آدرس <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> بررسی شدند.

شناسایی گونه‌های مختلف اتروکوکوس به واسطه PCR

جهت انجام واکنش PCR برای هر نمونه به این صورت عمل شد: ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده به همراه ۱۲ میکرولیتر از مستر میکس قرمز (Ampliqon آلمان) (شامل Tris-HCl PH8.5، (NH₄)SO₄، MmdNTP 4/4، 0/2% Tween 20، 3mMMgcl₂ Insert red dye، unit Ampliqon polymeras 0/2 and stabilizer) و ۱ میکرولیت از هر پرایمر به غلظت ۱۰ پیکومولار داخل میکروتیوب‌های ۰/۲ RNAAs/DNAAs Free (BioFil کره جنوبی) ریخته شد و برای رساندن حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر به آن آب مقطر اضافه گردید. برای تکثیر ژن‌های مورد نظر از دستگاه ترموسایکلر Eppendorf (کشور آلمان) با تنظیمات سیکل دمایی به صورت شوک حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، و تعداد ۲۵ سیکل به صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه اعمال شد. دمای انلینگ برای ژن *Alanine racemase* ۵۷ درجه سانتی‌گراد، برای ژن *divIVA* ۵۹ درجه سانتی‌گراد و برای ژن‌های *EF-tu*، *vanC* و *16s* ۵۸ درجه سانتی‌گراد هر کدام به مدت ۶۰ ثانیه تعیین شد. طویل شدن نهایی هم در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه در نظر گرفته شد.

یافته ها

در تست های اولیه فونتیپی انجام شده جهت تشخیص اولیه گونه های انتروکوکوس در مواد غذایی، از مجموع ۱۳۵ نمونه مختلف، ۴۰ ایزوله (۲۸/۵۷ درصد) انتروکوکوس از گوشت مرغ، ۱۰ ایزوله (۶/۸ درصد) از پنیر، ۲۰ ایزوله (۱۳/۷۹ درصد) از شیر و ۴۵ ایزوله (۳۱/۰۳ درصد) از گوشت قرمز جداسازی شد. فراوانی گونه های مختلف انتروکوکوس در نمونه های مواد غذایی به صورت، ۶۹ ایزوله (۴۷/۵۸ درصد) انتروکوکوس فکالیس، ۳۵ ایزوله (۲۴/۱۳ درصد) انتروکوکوس فاسیوم، ۱۳ ایزوله (۸/۹ درصد) انتروکوکوس گالیناروم، ۹ ایزوله (۶/۹ درصد) انتروکوکوس آویوم و ۱۹ ایزوله (۱۳/۱ درصد) انتروکوکوس کاسلی فلاووس بودند. در این میان بیش ترین نمونه های انتروکوکوس فکالیس از گوشت قرمز و گوش سفید جداسازی شد (جدول شماره ۲). برای تعیین حساسیت پرایمرهای طراحی شده و مشخص کردن توانایی آن ها در شناسایی سایت های انحصاری مورد هدف در گونه های مختلف انتروکوکوس، رقت های مختلف DNA به همراه پرایمرهای مورد نظر، توسط تکنیک Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت تکثیر رقت های حاصل از تکثیر ژن های مورد مطالعه در باکتری های انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فاسیوم، انتروکوکوس گالیناروم، انتروکوکوس آویوم و انتروکوکوس کاسلی فلاووس به صورت منحنی های ذوب به دست آمد. نتایج حاصل از منحنی های ذوب نشان دهنده همپوشانی کامل واکنش های چندتایی در همه موارد بود. دمای به دست آمده از نتیجه Blast پرایمرها در پایگاه داده NCBI با دمای به دست آمده از دمای ذوب DNA در واکنش Real Time یکسان بودند. به طوری که منحنی حاصل از تکثیر ژن *divIVA* در انتروکوکوس فکالیس در همه رقت ها دمای ۷۶/۶ درجه سانتی گراد و منحنی های حاصل از تکثیر ژن *Alanine racemase* در انتروکوکوس فاسیوم دمای ۸۰/۹۳ درجه سانتی گراد، منحنی های

مقطر تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر اضافه شد. برای انجام آزمون حساسیت پرایمرهای طراحی شده با استفاده از تهیه استاندارد باکتریایی با غلظت نیم مک فارلند (1.5×10^8 CFU/ml)، اقدام به تهیه رقت سریال از 10^6 تا 10^0 باکتری شد و به صورت سه تایی (Triplicate) در سه روز متوالی برای رقت های تهیه شده آزمون Real Time PCR انجام شد و با استفاده از تکرارپذیری تست انجام شده، حساسیت آزمون طراحی شده به دست آمد. هم چنین به منظور انجام آزمون اختصاصیت پرایمرهای تهیه شده از سویه DNA سویه استاندارد *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 به عنوان کنترل مثبت و از سویه DNA *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Staphylococcus aureus* 29213 به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای جداسازی گونه های مختلف انتروکوک از یکدیگر در آنالیز Melting curve استفاده شد. در پایان واکنش، منحنی استاندارد بر اساس لگاریتم غلظت DNA محور افقی و سیکل آستانه (محور عمودی) ترسیم شد. از شیب منحنی استاندارد برای محاسبه راندمان واکنش تکثیری استفاده شد.

آنالیز و بررسی داده ها

برای آنالیز نتایج حاصل تعیین توالی محصولات پرایمرهای گونه های مختلف از نرم افزار Chromas نسخه ۲,۵۱ استفاده شد. تحلیل داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS (IBM آمریکا)، انجام شد. حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری منفی و ارزش اخباری مثبت روش های فونتیپی و Real time PCR جهت تعیین گونه های مختلف انتروکوکوس با استفاده از تحلیل های آماری صورت گرفت. در این بررسی نتایج به دست آمده از تعیین توالی تست مولکولی PCR به عنوان شاخص استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. جهت بررسی ارتباط معنی دار بودن داده های به دست آمده نیز از آزمون آماری Chi-squver با ضریب اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد ($p < 0.05$).

جفت باز مربوط به تکثیر موفقیت آمیز ژن *VanC* انتروکوکوس گالیناروم، طول ۱۷۱ جفت باز مربوط به تکثیر موفقیت آمیز ژن *EF-tu* انتروکوکوس کاسلی فلاووس و طول ۱۳۸ جفت باز مربوط به تکثیر ژن *16S* انتروکوکوس آویوم به دست آمد. نتایج حاصل از Blast محصولات ژن *divIVA* در باکتری *Enterococcus faecalis* تکثیر ژن *Alanine racemase* در باکتری *Enterococcus faecium*، ژن *vanC* در انتروکوکوس گالیناروم، ژن *S16* در انتروکوکوس آویوم و ژن *EF-tu* در انتروکوکوس کاسلی فلاووس (*Enterococcus casseliflavus*) نشان دهنده عدم همولوژی پرایمرهای طراحی شده با باکتری های دیگر بود (تصویر شماره ۱). هم چنین نتایج هم ترازبندی نشان دهنده حساسیت و اختصاصیت بسیار مناسب برای شناسایی باکتری های مورد مطالعه بودند.

با استفاده تعیین مقادیر P-Value برای گونه های مختلف، مقادیر به دست آمده برای وجود یا عدم وجود ارتباط بین پراکنش گونه های انتروکوکوس و نوع و تعداد مواد غذایی به دست آمد (جدول شماره ۳). به منظور انجام آزمون اختصاصیت پرایمرهای تهیه شده از نمونه DNA باکتری استافیلوکوک اورئوس برای تعیین اختصاصیت پرایمرهای انتروکوکوس فکالیس و هم چنین برای تعیین اختصاصیت پرایمرهای انتروکوکوس فاسیوم از باکتری اشیشیاکلی استفاده شد. دماهای به دست آمده در پایان واکنش و منحنی های ایجاد شده، نشان دهنده عدم شناسایی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه برای سایر باکتری بود (جدول شماره ۳).

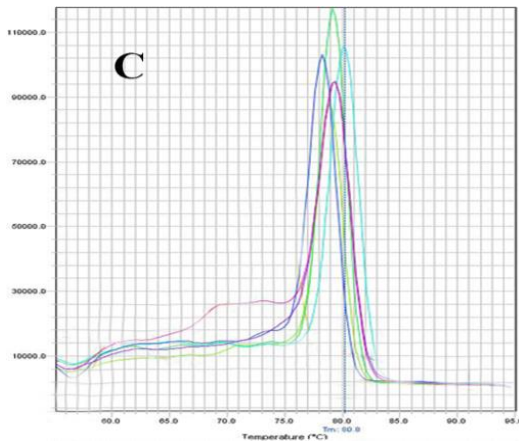
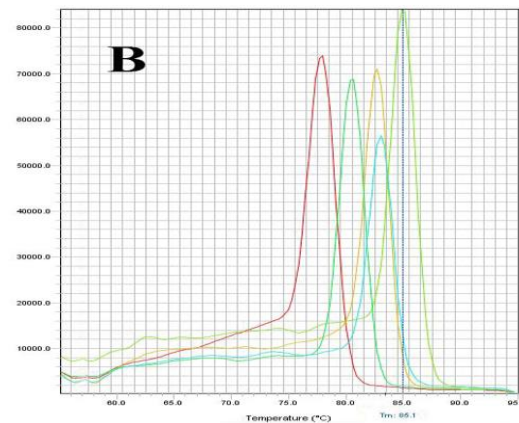
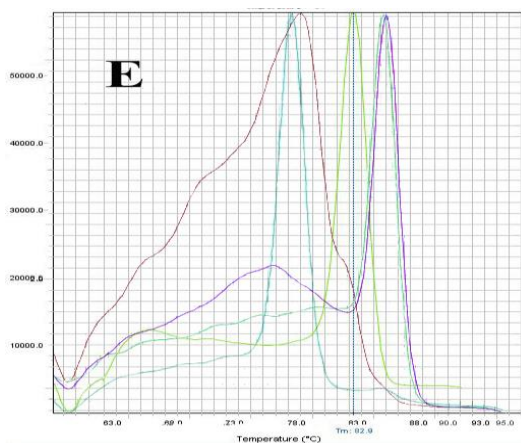
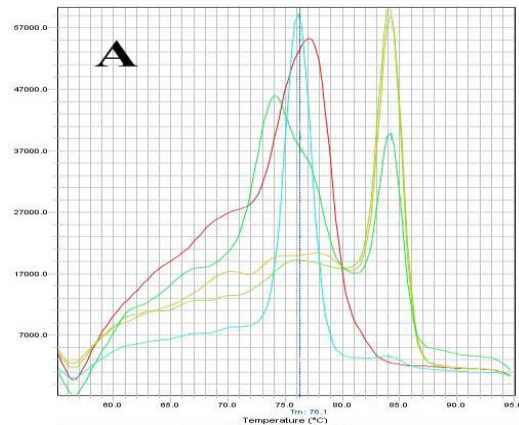
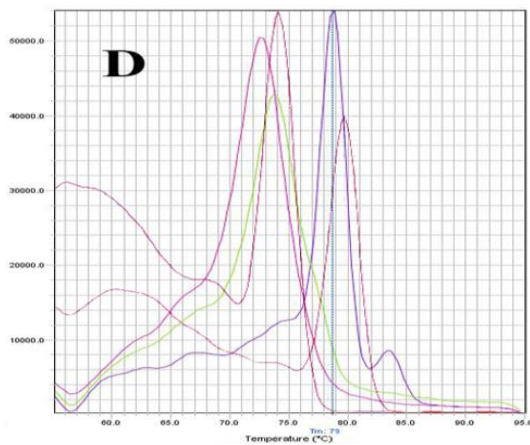
حاصل از تکثیر ژن *EF-tu* در انتروکوکوس کاسلی فلاووس دمای ۸۲/۹ درجه سانتی گراد، منحنی های حاصل از تکثیر ژن *vanC* در انتروکوکوس گالیناروم دمای ۷۹/۱ درجه سانتی گراد و منحنی های حاصل از تکثیر ژن *16S* در انتروکوکوس آویوم دمای ۸۵/۱ درجه سانتی گراد را نشان داد (نمودار شماره ۱) (جدول شماره ۲). تحلیل منحنی های آستانه مربوط به ژن های گونه ای مختلف انتروکوکوس، نشان دهنده شروع موفق همانندسازی در سیکل های مختلف در همه رقت های تهیه شده بود (نمودار شماره ۱). با به دست آوردن غلظت در رقت های ۱۰^۱ تا ۱۰^۷ مشخص شد که پرایمر طراحی شده برای انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس قدرت شناسایی 15CFU باکتری، پرایمر طراحی شده برای انتروکوکوس آویوم قدرت شناسایی ۲۰ باکتری، پرایمر طراحی شده برای انتروکوکوس گالیناروم قدرت شناسایی ۱۰ باکتری و پرایمرهای طراحی شده برای انتروکوکوس کاسلی فلاووس قدرت شناسایی ۲۵ باکتری را دارا می باشد (جدول شماره ۳). با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به همراه DNA های گونه های متفاوت، اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده تعیین شد. جهت بررسی کیفیت قطعات ژنومی تکثیر شده در واکنش Real time PCR، محصولات واکنش در ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد بارگذاری شدند. از مارکر مولکولی با اندازه ۱۰۰ جفت بازی در واکنش فوق، استفاده شد و باندهایی به طول ۱۲۳ جفت باز مربوط به تکثیر موفقیت آمیز ژن *divIVA* انتروکوکوس فکالیس، طول ۲۴۸ جفت باز مربوط به تکثیر موفقیت آمیز ژن *Alanine racemase* انتروکوکوس فاسیوم، طول ۱۵۸

جدول شماره ۲: توزیع فراوانی گونه های مختلف انتروکوکوس بر اساس تست های فنوتیپی و ژنوتیپی در مواد غذایی

| P. Value (P≤0/05) | گونه های مختلف انتروکوکوس (n=۱۳۸) | | | | | | | | | | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------|--------------------------|--------------|----------------------------|--------------|------------------------|--------------|-------------------------------|--------------|-----------|
| | انتروکوکوس فکالیس (n=۸۴) | | انتروکوکوس فاسیوم (n=۴۸) | | انتروکوکوس گالیناروم (n=۱) | | انتروکوکوس آویوم (n=۴) | | انتروکوکوس کاسلی فلاووس (n=۱) | | |
| | ژنوتیپی مثبت | ژنوتیپی مثبت | ژنوتیپی مثبت | ژنوتیپی مثبت | ژنوتیپی مثبت | ژنوتیپی مثبت | ژنوتیپی مثبت | ژنوتیپی مثبت | ژنوتیپی مثبت | ژنوتیپی مثبت | |
| ۰/۰۳۳۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | پنیر |
| ۰/۰۱۲۱ | ۱ | ۲ | ۲ | ۰ | ۱ | ۲ | ۲۲ | ۲۲ | ۱۴ | ۲۹ | گوشت مرغ |
| ۰/۰۱۵۹ | ۰ | ۰ | ۰ | ۱ | ۰ | ۰ | ۱۹ | ۱۹ | ۴۱ | ۴۱ | گوشت قرمز |
| ۰/۰۴۹۱ | ۰ | ۰ | ۲ | ۱ | ۱ | ۰ | ۱ | ۱ | ۰ | ۱۰ | شیر |

جدول شماره ۳: نتایج حاصل از بررسی تعیین غلظت و OD در رقت‌های مختلف DNA باکتری‌های انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس با استفاده از دستگاه نانودراپ

| غلظت و OD های به دست آمده در رقت‌های متفاوت | | | | | | | | استوک | OD | باکتری مورد مطالعه |
|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------|-------|------------------------|--------------------|
| ۱۰ ^{-۱} | ۱۰ ^{-۲} | ۱۰ ^{-۳} | ۱۰ ^{-۴} | ۱۰ ^{-۵} | ۱۰ ^{-۶} | ۱۰ ^{-۷} | | | | |
| ۰/۱ | ۰/۶ | ۰/۸ | ۱/۴ | ۱/۱ | ۱/۳ | ۴/۰۹ | ۲/۳ | OD | انتروکوکوس فکالیس | |
| ۰/۰۰۰۶pg | ۰/۰۰۵۷pg | ۰/۷۵pg | ۰/۷pg | ۸/۱۲pg | ۰/۰۷ng | ۰/۷۹ng | ۸ng | Con | | |
| ۰/۷۸ | ۱ | ۰/۴۸ | ۰/۹۱ | ۰/۹ | ۰/۹۳ | ۲ | ۱/۱۴ | OD | انتروکوکوس فاسیوم | |
| ۰/۰۰۰۰۳۸pg | ۰/۰۰۰۳pg | ۰/۰۴۲pg | ۰/۵۱pg | ۴/۹pg | ۰/۰۶۱ng | ۰/۵۳ng | ۵/۶۴ng | Con | | |
| ۰/۷۹ | ۰/۶ | ۰/۹۷ | ۳/۹ | ۲/۳ | ۱/۹ | ۳/۱ | ۴/۴ | OD | انتروکوکوس کاسلی فلاوس | |
| ۰/۰۰۰۰۱۶pg | ۰/۰۰۰۶۸pg | ۰/۰۷۹pg | ۰/۸۵pg | ۹/۱pg | ۰/۱۸۱ng | ۱ng | ۹/۳ng | Con | | |
| ۰/۷۸ | ۰/۴۹ | ۰/۹۷ | ۱/۸۹ | ۱/۲۹ | ۲/۲ | ۲ | ۴/۵ | OD | انتروکوکوس آیوم | |
| ۰/۰۰۰۰۳۹pg | ۰/۰۰۰۴۵pg | ۰/۰۰۵pg | ۰/۳۹pg | ۵/۹pg | ۰/۰۶۳ng | ۰/۵۱ng | ۵/۳ng | Con | | |
| ۰/۴۹ | ۰/۹۳ | ۰/۸۳ | ۰/۹ | ۲/۴ | ۱/۹ | ۳/۱ | ۲/۵ | OD | انتروکوکوس گالیناروم | |
| ۰/۰۰۰۴۲pg | ۰/۰۰۶۷pg | ۰/۰۶۵pg | ۰/۵۷pg | ۴/۹۲pg | ۰/۵۷ng | ۰/۷ng | ۶/۰۱ng | Con | | |

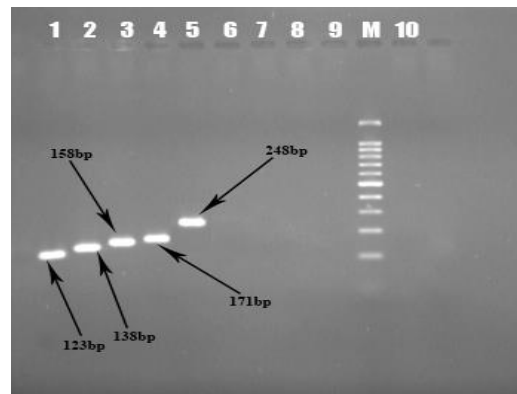


نمودار شماره ۱: منحنی‌های ذوب Multiplex Real Time حاصل از DNA و پرایمرهای گونه‌های مختلف انتروکوکوس بر اساس دما (محور افقی) و مشتق سیگنال فلورسنت (محور عمودی). A: انتروکوکوس فکالیس (۷۶/۶ درجه سانتی‌گراد). B: انتروکوکوس آیوم (۸۵/۱ درجه سانتی‌گراد). C: انتروکوکوس فاسیوم (۸۰/۸ درجه سانتی‌گراد). D: انتروکوکوس گالیناروم (۷۹/۱ درجه سانتی‌گراد). E: انتروکوکوس کاسلی فلاوس (۸۲/۹ درجه سانتی‌گراد).

آویوم ۱۰۰ درصد و ۱۰۰ درصد، برای *انتروکوکوس فکالیس* ۹۷/۶۱ درصد و ۹۰/۷۴ درصد، برای *انتروکوکوس فاسیوم* ۹۶/۰۷ درصد و ۹۸/۹ درصد، برای *انتروکوکوس گالیناروم* ۱۰۰ درصد و ۱۰۰ درصد، و برای *انتروکوکوس کاسلی فلاووس* ۱۰۰ درصد و ۱۰۰ درصد بود.

بحث

روش‌های فنوتیپی رایج برای تشخیص این باکتری‌ها در بیش‌تر مواقع با خطا همراه است. استفاده از روش‌های مولکولی حساس مانند Multiplex Real time PCR و طراحی پرایمرهای اختصاصی برای شناسایی *انتروکوکوس*‌ها می‌تواند خطاها احتمالی را از بین ببرد. در مطالعه حاضر که به جداسازی گونه‌های مختلف *انتروکوکوس* از نمونه‌های مواد غذایی پرداخته شد، با هدف قرار دادن قسمت‌های خاصی از گونه‌های *انتروکوکوس فاسیوم*، *انتروکوکوس فکالیس*، *انتروکوکوس آویوم*، *انتروکوکوس گالیناروم* و *انتروکوکوس کاسلی فلاووس* و طراحی پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های کدکننده این قسمت‌ها، شناسایی گونه‌های مختلف در مواد غذایی با موفقیت انجام شد. در روش فنوتیپی، از ۱۴۵ نمونه گرفته شده، ۸۷ ایزوله (۶۰ درصد) به عنوان *انتروکوکوس فکالیس* و ۴۴ ایزوله (۳۰/۳۴ درصد) به عنوان *انتروکوکوس فاسیوم* شناسایی شدند. درحالی‌که با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در کنار روش Multiplex Real time PCR برای این دو گونه، ۸۹ ایزوله (۶۱/۳۷ درصد) *انتروکوکوس فکالیس* و ۴۵ ایزوله (۳۱/۰۳ درصد) *انتروکوکوس فاسیوم* تعیین شدند. این در حالی بود که حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی روش فنوتیپی در مقایسه با شاخص استاندارد تعیین شده (تعیین توالی) برای *انتروکوکوس فکالیس* ۹۴/۸۷ درصد، ۹۰/۴۷ درصد، ۹۰/۲۴ درصد و ۹۷/۷۷ درصد و برای *انتروکوکوس فاسیوم* به ترتیب ۸۹/۱۳ درصد، ۹۷/۷۷ درصد، ۹۵/۳۴ درصد و ۹۴/۶۲ درصد به دست آمد.



تصویر شماره ۱: نتایج الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن‌های مورد مطالعه بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. چاهک ۱: ژن *divIVA* مربوط به *انتروکوکوس فکالیس* به طول ۱۲۳ جفت باز. چاهک ۲: ژن *16S* مربوط به *انتروکوکوس آویوم* به طول ۱۳۸ جفت باز. چاهک ۳: ژن *VanC* مربوط به *انتروکوکوس گالیناروم* به طول ۱۵۸ جفت باز. چاهک ۴: ژن *EF-tu* مربوط به *انتروکوکوس کاسلی* به طول ۱۷۱ جفت باز. چاهک ۵: ژن *Alanine racemase* مربوط به *انتروکوکوس فاسیوم فلاووس* به طول ۲۴۸ جفت باز. چاهک‌های ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰: کنترل منفی. چاهک ۱۰: مارکر مولکولی با اندازه ۱۰۰ جفت باز.

با استفاده از تعیین توالی محصولات به دست آمده از آزمون PCR که به عنوان گلداستاندارد قرار داده شد، حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی روش‌های کشت و Real Time PCR به دست آمد. حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی روش فنوتیپی برای گونه‌های مختلف *انتروکوکوس* به صورت زیر بود: *انتروکوکوس آویوم*: ۹۸/۵۲ درصد، ۶۶/۶۶ درصد، ۹۸/۵۲ درصد، ۹۸/۵۲ درصد، *انتروکوکوس فکالیس*: ۹۴/۸۷ درصد، ۹۰/۴۷ درصد، ۹۰/۲۴ درصد و ۹۵ درصد، *انتروکوکوس فاسیوم*: ۹۴/۶۲ درصد، ۸۹/۱۳ درصد، ۹۷/۷۷ درصد و ۹۵/۳۴ درصد، *انتروکوکوس کاسلی فلاووس*: ۵۰ درصد، ۹۸/۵۶ درصد، ۹۹/۲۷ درصد و ۳۳/۳۳ درصد، *انتروکوکوس گالیناروم*: ۵۰ درصد، ۹۸/۵۲ درصد، ۳۳/۳۳ درصد و ۹۹/۲۵ درصد. هم‌چنین حساسیت، ویژگی برای روش Real Time PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای *انتروکوکوس*

نتایج فوق برای روش Real Time PCR در مقایسه با شاخص استاندارد تعیین شده، در نتایجی که Gaëlle Cuzon و همکاران در سال ۲۰۰۸ به دست آوردند، وجود اختلاف بالا در حساسیت و ویژگی روش های فنوتیپی جهت تشخیص سویه های مقاوم این دو گونه مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن نشان دهنده وجود خطاهای احتمالی در روش های فنوتیپی جهت تعیین گونه و سویه های یک گونه می باشد (۱۱). این امر نشان دهنده وجود خطاهای احتمالی در انجام تست های فنوتیپی می باشد. در استفاده از روش Melting Curve Analyzing که بر اساس تجزیه و تحلیل منحنی حاصل از ذوب DNA می باشد، می توان خطاهای احتمالی بر اساس تست های فنوتیپی را از بین برد. حساسیت این روش ارتباط بسیاری به پرایمرهای طراحی شده و مورد استفاده دارد. حساسیت و ویژگی تست های فنوتیپی برای انتروکوکوس آویوم ۶۶/۶۶ درصد، ۹۸/۵۲ درصد، برای انتروکوکوس گالیناروم ۵۰ درصد، ۹۸/۵۲ درصد و برای انتروکوکوس کاسلی فلاووس ۵۰ درصد و ۹۸/۵۶ درصد به دست آمدند. در گزارشاتی که Anton Mak و همکاران در سال ۲۰۰۹ با مقایسه روش های فنوتیپی و ژنوتیپی ساده ارائه دادند، خطاهای روش های فنوتیپی در تعیین گونه و برخی سویه های مقاوم را مشاهده کردند. در این بررسی که از PCR معمولی جهت این مقایسه استفاده شده بود، اختلاف حساسیت و ویژگی روش ها قابل تامل بود، در حالی که در مطالعه حاضر از روش حساس تر و دقیق تر Real Time استفاده شده است که در نهایت این اختلاف معنی دار را در مورد حساسیت روش ها سبب شده است (۱۵).

Woksepp و همکاران در مطالعات خود در سال ۲۰۱۴ از روش آنالیز منحنی ذوب DNA های باکتری های مختلف استفاده کردند، دسته بندی باکتری مطابق با این روش با بالاترین حساسیت صورت گرفت. در این بررسی، حساسیت این روش در تعیین گونه انتروکوکوس ها با روش Multilocus sequence typing (MLST) مورد

ارزیابی قرار گرفت. در مقایسه با MLST دارای حساسیت بسیار مناسبی بود (۱۲). در مطالعه حاضر، با توجه به تعیین توالی پرایمرهای طراحی شده و عدم همولوژی آنها، قدرت پرایمرهای پیشنهادی به گونه ای است که برای انتروکوکوس فکالیس و فاسیوم توانایی شناسایی ۱۵ باکتری، برای انتروکوکوس آویوم ۲۵ باکتری، برای انتروکوکوس کاسلی فلاووس ۲۰ باکتری و برای انتروکوکوس گالیناروم توانایی شناسایی ۱۰ CFU/ml باکتری را دارا می باشد. نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعات Pendle و همکاران که در سال ۲۰۰۸ در استرالیا انجام شد، نسبتاً همخوانی دارد (۱۶). گونه های مختلف انتروکوکوس دارای همولوژی نزدیکی به هم هستند. در مطالعه انجام شده توسط ما نیز این مورد در تست های فنوتیپی دیده شد، به طوری که در ۵ مورد گزارش انتروکوکوس گالیناروم و ۳ مورد گزارش انتروکوکوس آویوم با تست های مولکولی به ترتیب ۲ مورد از انتروکوکوس گالیناروم، انتروکوکوس فاسیوم و ۱ مورد از انتروکوکوس آویوم، انتروکوکوس فکالیس تشخیص داده شد. این در حالی است که ارزش تشخیصی روش آنالیز ذوب مبتنی بر Multiplex Real time PCR در مواقعی که همولوژی های نزدیک بین گونه ایی وجود داشته باشد، می تواند با تکیه بر حساسیت بالای خود، گونه هایی که دارای همولوژی نزدیک هستند را نیز از یکدیگر تفریق کند. این مورد در مطالعات Choong-Hwan Cha و همکاران در کره در سال ۲۰۱۰ انجام داده بودند، به خوبی مشاهده شد که در نهایت موفق به شناسایی گونه های انتروکوکوس فاسیوم و فکالیس از یکدیگر شدند. نتایج حاصل از این بررسی با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همخوانی داشت و نتایج مشابهی را می توان در هر دو مطالعه مشاهده کرد (۶).

در مطالعاتی که توسط Krawczyk و همکاران که در سال ۲۰۰۷ انجام گرفت، طراحی پرو فایل ذوب را در کنار روش PFGE مورد استفاده قرار گرفت تا حساسیت آن را افزایش دهد (۱۷). این در حالی بود که استفاده از

روش MCV خود به تنهایی نیز قادر به شناسایی گونه‌ها نیز می‌باشد. عدم انتخاب سایت مناسب و پرایمرهای اختصاصی را می‌توان در مطالعات Martin و همکاران که در سال ۲۰۰۸ در اسپانیا که بر روی گونه‌های مختلف انتروکوکوس انجام شد، با استفاده از روش آنالیز منحنی ذوب مبتنی بر آنزیم‌های محدودکننده سایت‌های *16s* و *23s* را به عنوان هدف قرار دادند که در برخی موارد بروز همولوژی‌های مشابه منجر به گزارش‌های منفی کاذب و مثبت کاذب شد (۱۸). علاوه بر این، در مطالعاتی که Peliccioli Riboldi و همکاران در سال ۲۰۰۸ در برزیل انجام دادند، همولوژی گونه‌های مختلف انتروکوکوس در مواد غذایی را با استفاده از روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی مورد بررسی قرار دادند. در این ارزیابی مشخص شد که روش‌های فنوتیپی دارای مقدار قابل ملاحظه‌ای خطا می‌باشد. به نحوی که حتی با منفی شدن برخی تست‌های فوتیپی در تشخیص اولیه گونه‌های انتروکوکوس، در برخی موارد تست‌های ژنوتیپی آن‌ها مثبت شده و نتیجه گزارش را تحت تاثیر قرار داد (۱۹). در امر تشخیص باکتری‌ها، به خصوص باکتری‌هایی مانند انتروکوکوس‌ها مقرون به صرفه بودن اهمیت زیادی دارد. در مطالعاتی که Tan و همکاران در سال ۲۰۱۵ در سنگاپور انجام دادند، با پیشنهاد روش Tetraplex real time PCR و استفاده هم‌زمان از همه پرایمرها در یک تیوب، علاوه بر این که مقرون به صرفه بودن این روش را تایید کرد، هم‌چنین نتیجه نهایی را با روش‌های فنوتیپی در سنجش گونه‌های مقاوم ارزیابی کرد که در نهایت ارزش استفاده از این روش را بیش‌تر دانست. این نتایج با مطالعه حاضر که به صورت Multiplex (Pantaplex) Real Time PCR انجام شد، از نظر مقرون به صرفه بودن کاملاً همخوانی دارد، این امر با استفاده از پنج جفت پرایمر در مطالعه حاضر به جای استفاده از چهار جفت در مطالعه Tan بیش‌تر خود را نشان می‌دهد (۲۰). با استناد به مطالعات انجام شده در زمینه تشخیص گونه‌های مختلف انتروکوکوس در مواد

غذایی، علاوه بر این که این گروه از باکتری‌ها در آلوده کردن مواد غذایی نقش مهمی دارند، سهم انتروکوکوس‌ها در انتقال مقاومت‌های دارویی از طریق مواد غذایی این موضوع را با اهمیت بیش‌تری همراه می‌کند (۲۰). در نهایت می‌توان نتیجه گرفت انتشار مقاومت که از طریق زنجیره غذایی وارد فلور انتروکوکوسی انسانی می‌شود و این ویژگی را به گونه‌های پاتوژن منتقل می‌کند (یعنی پیدایش اخیر *Staphylococcus aureus* با حساسیت کاهش یافته به ونکومايسين)، نیاز به کنترل بیش‌تر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی در تغذیه حیوانات و بررسی‌های دقیق گونه‌های انتروکوکوس در مواد غذایی توسط روش‌های حساس را بیش‌تر از پیش نشان می‌دهد. این موارد با بررسی ارتباط بین حضور گونه‌های مختلف انتروکوکوس و نوع ماده غذایی مورد استفاده جهت جداسازی ایزوله‌ها، قطعیت بیش‌تری پیدا کرد (۲۱). وجود ارتباط معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بین این متغیرها، نشان داد که در نمونه‌های گوشتی اعم از گوشت مرغ و گوشت قرمز، فراوانی گونه‌های مختلف، خصوصاً گونه‌های خطرناک مانند انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم بیش‌تر می‌باشد. این امر زمانی معنی‌دار بودن خود را بیش‌تر نشان می‌دهد که حضور این سویه‌ها در بیماری‌های بالینی بیش‌تر از گونه‌های دیگر انتروکوکوس می‌باشد و این امر می‌تواند منشا حیوانی این انتقالات را تایید کند. به طوری که با مصرف گوشت‌های نیم پز و یا با آلودگی بالا، علاوه بر انتقال سویه‌های بیماری‌زا، می‌توان انتظار انتقال ژن‌های عامل مقاومت به داروها را نیز داشت (۲۲). از این رو، بررسی دقیق‌تر با استفاده از روش‌هایی با حساسیت و ویژگی بالا، می‌تواند در شناسایی این گونه‌های بیماری‌زا کمک کننده باشد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه تحت عنوان طراحی روش Multiplex Real Time PCR به منظور شناسایی

مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان به انجام رسیده است. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از این معاونت محترم ابراز می‌دارند.

ایزوله‌های جدا شده گونه‌های انتروکوک از نمونه‌های کلینیکی و مواد غذایی بر اساس روش Melting Curve Analysis در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۴ به شماره ۹۳۱۲۲۶۱۹ است که با حمایت

References

- Bhardwaj A, Malik RK, Chauhan P. Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. *Indian J Microbiol.* 2008; 48(3): 317-325.
- Valenzuela AS, Omar NB, Abriouel H, Lopez RL, Ortega E, Canamero MM, et al. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(8): 2648-2652.
- Tansuphasiri U, Khaminthakul D, Pandii W. Antibiotic resistance of enterococci isolated from frozen foods and environmental water. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006; 37(1): 162-170.
- Pedonese F, Innocenti E, Nuvoloni R, Sartini L, D'Ascenzi C, Cerri D, et al. Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in foods of animal origin purchased in Tuscany. *Vet Res Commun* 2005; 29(2): 347-349.
- Ben Omar N, Castro A, Lucas R, Abriouel H, Yousif NM, Franz CM, et al. Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods. *Syst Appl Microbiol* 2004; 27(1): 118-130.
- Cha C-H, An HK, Kim JU. Detection of Vancomycin-resistant Enterococci using Multiplex Real-time PCR Assay and Melting Curve Analysis. *Korean J Lab Med* 2010; 30(2): 138-146.
- Lozano C, Gonzalez-Barrio D, Camacho MC, Lima-Barbero JF, de la Puente J, Hofle U, et al. Characterization of fecal vancomycin-resistant enterococci with acquired and intrinsic resistance mechanisms in wild animals, Spain. *Microb Ecol* 2015; 21(11): 129-135.
- Giraffa G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev* 2002; 26(2): 163-171.
- Hammerum AM, Lester CH, Heuer OE. Antimicrobial-resistant enterococci in animals and meat: a human health hazard? *Foodborne Pathog Dis* 2010; 7(10): 1137-1146.
- Fang H, Ohlsson AK, Ullberg M, Ozenci V. Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK 2 system for the identification of clinical Enterococcus isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31(11): 3073-3037.
- Camargo CH, Bruder-Nascimento A, Lee SHI, Júnior AF, Kaneno R, Rall VLM. Prevalence and phenotypic characterization of Enterococcus spp. isolated from food in Brazil. *Braz J Microbiol* 2014; 45(1): 111-115.
- Woksepp H, Ryberg A, Billstrom H, Hallgren A, Nilsson LE, Marklund BI, et al. Evaluation of high-resolution melting curve analysis of ligation-mediated real-time PCR, a rapid method for epidemiological typing of ESKAPE (Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, and Enterobacter Species) pathogens. *J Clin Microbiol* 2014; 52(12): 4339-4342.
- Tong SY, Giffard PM. Microbiological applications of high-resolution melting analysis. *J Clin Microbiol* 2012; 50(11): 3418-3421.

14. Manero A, Blanch AR. Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. *Appl Environ Microb* 1999; 65(10): 4425-4430.
15. Mak A, Miller MA, Chong G, Monczak Y. Comparison of PCR and Culture for VRE Screening. *J Clin Microbiol* 2009; 4(7): 4136-4137.
16. Pendle S, Jelfs P, Olma T, Su Y, Gilroy N, Gilbert GL. Difficulties in detection and identification of *Enterococcus faecium* with low-level inducible resistance to vancomycin, during a hospital outbreak. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(9): 853-857.
17. Krawczyk B, Leibner J, Stojowska K, Bronk M, Samet A, Kur J. PCR melting profile method for genotyping analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Hematological Unit patients. *Pol J Microbiol* 2007; 56(2): 65-70.
18. Martin B, Garriga M, Aymerich T. Identification of *Enterococcus* species by melting curve analysis of restriction fragments. *J Microbiol Methods* 2008; 75(1): 145-147.
19. Pelicioli Riboldi G, Preusser de Mattos E, Guedes Frazzon AP, Alves d'Azevedo P, Frazzon J. Phenotypic and genotypic heterogeneity of *Enterococcus* species isolated from food in Southern Brazil. *J Basic Microbiol* 2008; 48(1): 31-37.
20. Tan TY, Jiang B, Ng LS. Faster and economical screening for vancomycin-resistant enterococci by sequential use of chromogenic agar and real-time polymerase chain reaction. *J Microbiol Immunol Infect* 2015; 22(8): 211-221.
21. Porto BC, Fujimoto G, Borges MdF, Bruno LM, Carvalho JDG. Determinantes de virulência em *Enterococcus* endógenos de queijo artesanal. *Revista Ciência Agronômica* 2016; 47(3): 69-76.
22. Alonso M, Marin M, Iglesias C, Cercenado E, Bouza E, Garcia de Viedma D. Rapid identification of linezolid resistance in *Enterococcus* spp. based on high-resolution melting analysis. *J Microbiol Methods* 2014; 98(9): 41-43.