بررسی فراوانی فاکتورهای حدت در ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از همبرگر

راضیه مهدیان[1]، الهه تاج بخش[2]*، زهرا بم زاده[2]

۱.دانش آموخته میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲.گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

***نویسنده مسئول:** *ee_tajbakhsh@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۹

چکیده

*انتروکوک*ها از جمله میکروارگانیسم‌هایی هستند که عمدتاً در روده‌ها یافت می‌شوند. حضور زیاد آن‌ها در مواد غذایی می‌تواند دلیلی بر آلودگی مدفوعی باشد و از انواع مواد غذایی مانند سبزیجات، گوشت و غیره جدا شده‌اند. از بین مواد غذایی همبرگر از جمله محصولاتی است که به‌صورت دست‌ساز و به‌طورگسترده توسط اقشار مختلف مردم استفاده می‌شود. در این تحقیق تعداد ۵۰ نمونه همبرگر با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی از نظر وجود *انتروکوکوس فکالیس* مورد بررسی قرار گرفتند. به‌منظور ردیابی ژن‌های ویرولانس در حضور زوج پرایمرهای اختصاصی با رعایت برنامه دمایی واکنش PCR صورت گرفت. از سویه استاندارد *انتروکوکوس فکالیس* ATCC 29212 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. در این تحقیق از مجموع ۵۰ نمونه مورد مطالعه تعداد ۳۳ نمونه (۶۶ درصد) آلوده به باکتری *انتروکوکوس فکالیس* تشخیص داده شدند. از ۳۳ ایزوله *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از همبرگر، ژن *efaA* در۸ ایزوله (۲۴/۲۴ درصد) ، ژن *cylA* در ۱۵ ایزوله (۴۵/۴۵ درصد)، ژن *gel E* در ۹ ایزوله (۲۷/۲۷ درصد) ، ژن*esp* در ۲ ایزوله (۶/۰۶ درصد)، ژن *agg* در۲ ایزوله (۶/۰۶ درصد)، و ژن‌های *aca, asa* و *cylB* در هیچ یک از ایزوله ها مشاهده نگردید. *انتروکوک*ها و *کلی فرم*ها به‌عنوان دو شاخص مهم بهداشتی مطرح هستند. با توجه به این‌که حضور زیاد انتروکوک‌ها در مواد غذایی می‌تواند دلیلی بر آلودگی مدفوعی باشد، نتایج حاصل از این تحقیق نشان دهنده آلودگی زیاد همبرگرهای عرضه شده در شهرستان شهرکرد می‌باشد

کلید واژه ها: *انتروکوکوس فکالیس*، همبرگر، ژن‌های ویرولانس.

مقدمه

انواع مختلفی از غذاهای آماده مصرف[1]در کشورها با توجه به زمینه‌های فرهنگی و اجتماعی متفاوت، وجود دارد که به دلیل تنوع زیاد، در دسترس بودن، عدم نیاز به زمان پخت و قیمت‌های نسبتاً ارزان باعث افزایش تقاضا در بین مردم شده‌اند. اگرچه دارای مزایایی می‌باشند اما ممکن است یک تهدید برای سلامت عمومی به شمار روند. تقاضا برای مواد غذایی سالم و بی خطر و عدم نیاز به آماده سازی و کار کردن با دست، منجر به افزایش تولید و مصرف غذاهای آماده مصرف شده است و مصرف کنندگان پر مشغله‌ی امروزه راحت‌تر می‌باشند، لذا مخاطرات میکروبیولوژیکی ناشی از مصرف این محصولات افزایش یافته است. روش فرآوری سنتی، دمای نگهداری نامناسب و بهداشت ضعیف شخصی که در تهیه غذا دخالت دارد، برخی از علل اصلی آلودگی غذاهای آماده مصرف هستند. طی مطالعات انجام شده، انتروکک‌ها و کلیفرم‌ها به‌عنوان دو شاخص مهم بهداشتی مطرح هستند.. تراکم بیش از حد مجاز آن‌ها در مواد غذایی بیانگر وضعیت نامطلوب بهداشتی است (رسولی پیروزیان و همکاران.، ۱۳۸۷، قاسمی و همکاران.، ۱۳۸۷، میرحسینی ۱۳۹۱). باکتری‌های جنس *انتروکوکوس*[2]، ارگانیسم‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی، تخم مرغی شکل و غیر اسپورزا، بی-

1- Ready-To-Eat (RTE)

2- *Enterococci*

هوازی اختیاری، جور تخمیر[3]با احتیاجات غذایی پیچیده هستند که اغلب در اکثر سبزیجات، گیاهان و مواد غذایی مخصوصا غذاهای با منشاء حیوانی حضور دارند. آن‌ها هم-چنین قسمتی از فلور میکروبی طبیعی روده بعضی از پستانداران و انسان را تشکیل می‌دهند. *انتروکوکوس فکالیس*[4]، *انتروکوکوس فاسیوم*[5] و *انتروکوکوس دورانس*[6]گونه هایی هستند که بیشترین فراوانی را در بین سایرگونه‌ها به خود اختصاص داده و به-طور فراوان درغذاهایی با منشا حیوانی یافت می‌شوند (Barbosa et al., 2010; Bettencourt et al., 2004). *انتروکوکوس فکالیس* ابتدا تحت جنس *استرپتوکوکوس* بود ولی درسال ۱۹۸۴ *انتروکوک* با استفاده از مطالعات هیبریداسیون DNA در جنس جداگانه قرار گرفت اندازه ژنوم این باکتری ۱۵۰ کیلو جفت باز می‌باشد و درصد G+C این باکتری ۳۲/۲ درصد درصد می‌باشد (Chow et al., 2003; Cosentino et al., 2010). در این باکتری چندین فاکتور ویرولانس شناسایی شده که شامل ماده تجمعی[7]، پروتئین سطحی *انتروکوک*[8]، همولایزین[9]، ژلاتیناز[10]، فاکتور اتصالی سطحی *انتروکوکی*[11]، آنتی‌ژن A *انتروکوکوس فکالیس* [12] و سیتولیزین *انتروکوکی*[13] می‌باشد. ژلاتیناز یک پروتئاز است که توسط *انتروکوکوس فکالیس* تولید شده و قادر است ژلاتین، کلاژن، کازئین و دیگر پپتیدها را هیدرولیز کند. یک لوکوس بیان ژن آن را برعهده دارد. چسبندگی سطحی یا پروتئین سطحی *انتروکوکی* از جمله دیگر فاکتورهای ویرولانس است که این پروتئین در دیواره سلولی باکتری قرارگرفته است. توالی ژن‌های کد کننده این پروتیئن در نمونه‌های کلینیکی بیش از نمونه‌های کومنسال است. این پروتئین باعث بقای باکتری در مثانه و ایجاد عفونت‌های مجاری ادراری می‌شود. ویرولانس این ارگانیسم با تنظیم ژن‌های کد کننده ویرولانس که بر روی ژنوم در ناحیه مشخصی به نام جزایر پاتوژنیسیتی[14] می‌باشند، تنظیم می‌گردد (Eton and Gasson., 2001; Feglo et al., 2012; Fukushima et al., 1997; Huycke et al., 1998; Hurlbert et al.,1998). تحقیق حاضر به‌منظور بررسی میزان آلودگی همبرگرهای عرضه شده به بازار مصرف شهرکرد به باکتری *انتروکوکوس فکالیس* و بررسی فراوانی فاکتورهای ویرولانس صورت گرفت.

روش کار

در این مطالعه توصیفی مقطعی در سال ۱۳۹۶ تعداد ۵۰ عدد همبرگر صنعتی از برندهای (شماره ۹-۱) با درصدهای گوشت مختلف از مراکز عرضه همبرگر در شهرستان شهرکرد تهیه و در شرایط استریل به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید. از سویه استاندارد *انتروکوکوس فکالیس* ATCC 29212[15] به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. برای جداسازی باکتری‌های *انتروکوکوس* از محیط کشت اختصاصی کانامایسین اسکولین آزید آگار استفاده گردید. برای این منظور از هر نمونه همبرگر ۵ گرم توزین و با ۱۰ میلی لیتر بافر نمکی فسفات مخلوط و یکنواخت گردید. سپس مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از محلول مورد نظر در یک پلیت حاوی محیط کانامایسین اسکولین آگار پخش گردید و به‌مدت ۲۴h در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند. کلونی‌های رشد یافته در هر پلیت پس از سپری شدن مدت انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفتند. تمام سویه‌ها از نظر رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، اکسیداز، رشد در حضور ۶/۵ درصد نمک و تخمیر قندهای آرابینوز، مانیتول، سوربیتول، لاکتوزو سوربوز تعیین هویت گردیدند (Jett et al., 1994).

[3]- Homofermentative
[4]- *Enterococcus faecalis*
[5]- *Enterococcus faecium*
[6]- *Enterococcus durans*
[7] - Aggregation substance (*agg*)
[8] - Enterococcal surface protein (*esp*)
[9] - Hemolysine (*hly*)
[10] - Gelatinase (*gel*)
[11]- Entrococcal surface adhesion (*eca*)
[12] - *Enterococcus faecalis* antigen A *(efa)*
[13] - Cytolysine (*cyl)*
[14] - Pathogenicity Islands
[15]- Asian Type Culture Colection

جدول (۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص قطعی و ژن‌های ویرولانس در ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس*

Target gene	Primer Oligonucleotide sequences (5'-3')	Accission Number	Size of amplicon (bp)
16sRNA	F: AACTGGAGGAAGGTGGGGAT R: AGGAGGTGATCCAACCGCA	CP015883.1	370
asa	F: CCAGCCAACTATGGCGGAATC R: CCTGTCGCAAGATCGACTGTA	CP22712	419
Gel E	F: ACCCCGTATCATTGGTTT R: ACGCATTGCTTTTCCATC	KU311665	629
Cyl A	F: TGGATGATAGTGATAGGAAGT R: TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	CP015883	517
Cyl M	F: CTGATGGAAAGAAGATAGTAT R: TGAGTTGGTCTGATTACATTT	AY032999	742
efa A	F: GACAGACCCTCACGAATA R: AGTTCATCATGCTGTAGTA	KY070337	705
Cyl B	F: ATTCCTACCTATGTTCTGTTA R: AATAAACTCTTCTTTTCCAAC	KU311664	843
ace	F: GAGCAAAAGTTCAATCGTTGAC R: GTCTGTCTTTTCACTTGTTTCT	AF159247	1003
agg	F: AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC R: AAACGGCAAGACAAGTAAATA	CP002493	1553
esp	F: TTGCTAATGCTAGTCCACGACC R: GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	AF034779	933

به‌منظور تائید قطعی *انتروکوکوس فکالیس* در نمونه‌های مورد بررسی، از آزمایش PCR در حضور زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول (۱)، ردیابی ژن *16srRNA* استفاده شد (Koluman et al., 2009). استخراج DNA با استفاده کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن)[16]مطابق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت.

برای ردیابی شایع‌ترین ژن‌های ویرولانس شامل *esp*، *agg*، *gel E* ، *eca*، *efaA* و *cyl A, B, M* از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول (۱) استفاده شد.

واکنش PCR بسته به اندازه قطعات ژنی در چند نوبت انجام شد. اجزای واکنش PCR و برنامه دمایی در جدول (۲) نشان داده شده است (Kristich et al., 2004).

[16]- DNPTM(CinnaGen)

جدول (۲) اجزای واکنش و برنامه ی دمایی و حجم مواد مصرفی در واکنش PCR

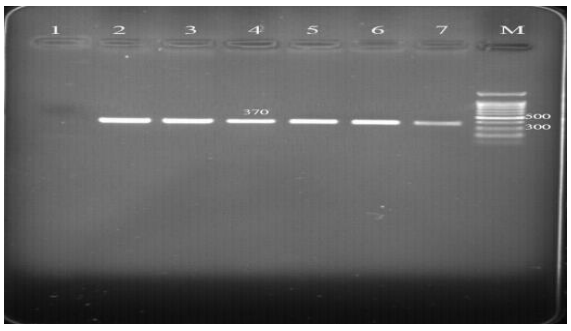
Gene	PCR programe	PCR Volume (50 µL)
16srRNA	1 cycle: 95 ^{0C} ---------- 5 min. 31 cycles: 95 ^{0C} ---------- 45 s 59 ^{0C} ---------- 60 s 72 ^{0C} ---------- 60 s 1 cycle: 72 ^{0C} ---------- 5 min	5 µL PCR buffer 10X 2 mM Mgcl2 200 µM dNTP (Fermentas) 0.4 µM of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template
Asa, gel E	1 cycle: 95 ^{0C} ---------- 5 min. 30 cycles: 95 ^{0C} ---------- 30 s 51 ^{0C} ---------- 30 s 72 ^{0C} ---------- 60 s 1 cycle: 72 ^{0C} ---------- 6 min	5 µl PCR buffer 10X 2.5 mm Mgcl2 200 µM dNTP (Fermentas) 0.5 µm of each primers F & R 2 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µl DNA template
Cyl A, cyl M, efa A	1 cycle: 95 ^{0C} ---------- 6 min. 30 cycles: 94 ^{0C} ---------- 60 s 55 ^{0C} ---------- 60 s 72 ^{0C} ---------- 45 s 1 cycle: 72 ^{0C} ---------- 7 min	5 µL PCR buffer 10X 2.5 mM Mgcl2 300 µM dNTP (Fermentas) 0.4 µM of each primers F & R 2 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template
Cyl B, ace, agg, esp	1 cycle: 94 ^{0C} ---------- 6 min. 35 cycles: 95 ^{0C} ---------- 60 s 54 ^{0C} ---------- 90 s 73 ^{0C} ---------- 45 s 1 cycle: 72 ^{0C} ---------- 7 min	5 µL PCR buffer 10X 2.5 mM Mgcl2 300 µM dNTP (Fermentas) 0.4 µM of each primers F & R 2 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template

جدول (۳) تعداد و درصد موارد مثبت آلودگی به *انتروکوکوس فکالیس* در نمونه‌های مختلف همبرگر

نوع همبرگر	درصد گوشت	تعداد و درصد موارد مثبت
شماره ۱	٪۶۰	۱۰ (۱۰۰٪)
شماره ۲	٪۳۰	۵ (۱۰۰٪)
شماره ۳	٪۳۰	۳ (۶۰٪)
شماره ۴	٪۳۰	۱

		(۲۰٪)
شماره ۵	٪۳۰	۴ (۸۰٪)
شماره ۶	۳۰٪	۱ (۲۰٪)
شماره ۷	۶۰٪	۱ (۲۰٪)
شماره ۸	۶۰٪	۴ (۸۰٪)
شماره ۹	۶۰٪	۴ (۸۰٪)
جمع		۳۳

در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین نوع همبرگر و آلودگی به *انتروکوکوس* ارتباط آماری معنی دار مشاهده گردید (P-Value =۰/۰۰۴). به این ترتیب مشخص می‌شود که با افزایش درصد گوشت درصد آلودگی بیشتر می‌شود. ایزوله‌های جدا شده به روش کشت و تأیید بیوشیمیایی، در حضور پرایمر *16srDNA* با داشتن باند ۳۷۰ جفت بازی، مثبت تشخیص داده شدند. نتایج در شکل (۱) نشان داده شده است.



شکل (۱): الکتروفورز محصولات PCR ژن *16srDNA* *انتروکوکوس فکالیس*. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز: ستون ۱ کنترل منفی. ستون ۲ کنترل مثبت، ستون‌های ۷-۳ نمونه‌های مثبت واجد باند ۳۷۰ جفت بازی

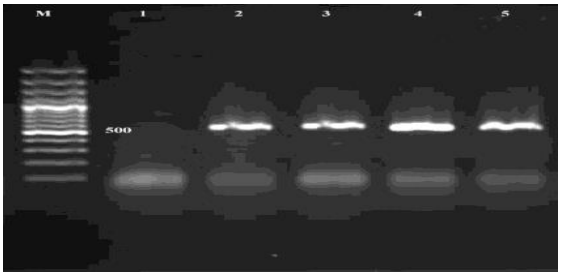
از ۳۳ ایزوله *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از همبرگر، ژن *efaA* در۸ ایزوله (۲۴/۲۴ درصد) ، ژن *cylA* در ۱۲ ایزوله (۳۶/۳۶ درصد)، ژن *gel E* در ۹ ایزوله (۲۷/۲۷ درصد) ، ژن*esp* در ۲ ایزوله (۶/۰۶ درصد)، ژن *agg* در۲ ایزوله (۶/۰۶ درصد)، و ژن‌های *cylM، ace, asa* و *cylB* در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نگردید. ژن‌های مذکور در برندهای ۵-۱ گزارش گردیدند. نتایج فراوانی ژن‌ها به تفکیک نوع همبرگر در جدول (۴) نشان داده شده است.

جدول (۴) فراوانی ژن‌های مورد بررسی به تفکیک نوع همبرگر

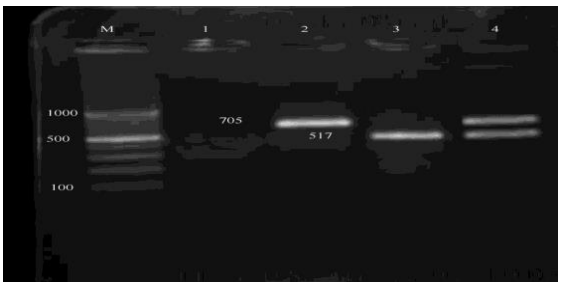
ژن / همبرگر	*cylA*	*gelE*	*efaA*	*esp*	*agg*
۱	۳ (٪۲۵)	۱ (۱۱/٪۱۱)	۳ (۳۷/۵ ٪)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)
۲	۰	۰	۰	۰	۰

	(٪۰)	(٪۰)	(٪۰)	(٪۰)	(٪۰)
۳	۶ (٪۵۰)	۸ (٪۸۹/۸۸)	۵ (٪۶۲/۵)	۲ (٪۱۰۰)	۲ (٪۱۰۰)
۴	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)
۵	۳ (٪۲۵)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)

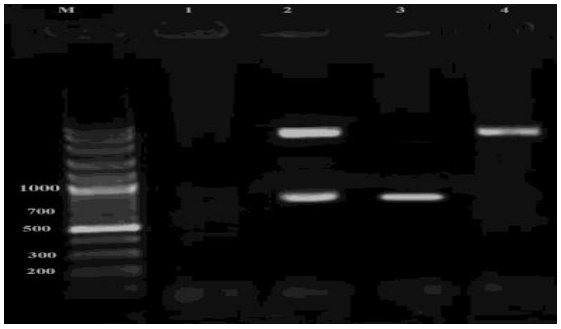
در شکل‌های (۲)، (۳) و (۴) الکتروفورز محصول PCR ژن‌های مذکور نشان داده شده است.



شکل (۲): الکتروفورز محصولات PCR ژن *gelE* (باند ۶۲۹ جفت بازی) . ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱ کنترل منفی، ستون‌های۵-۲ نمونه‌های مثبت واجد ژن *gel E*



شکل (۳): الکتروفورز محصولات PCR ژن‌های *cylA* و *efaA*. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱ کنترل منفی، ستون ۲: باند ۷۰۵ جفت بازی مربوط به ژن *efaA* ، ستون۳: باندهای ۵۱۷ و ۷۰۵ جفت بازی مر بوط به ژن‌های *cyl A* و *efaA*



شکل (۴): الکتروفورز محصولات PCR ژن‌های *agg* و *esp*. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱: کنترل منفی، ستون‌های ۲،۳ و ۴: باندهای ۱۵۵۳ جفت بازی و ۹۳۳ جفت بازی مربوط به ژن‌های *agg* و *esp*

در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین نوع همبرگر و نوع ژن ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید (P-Value = ۱/۰۰<۰)

بحث

بیماری‌های عفونی که توسط غذا یا آشامیدنی‌ها انتشار می یابند، معمولا رنج آور وگاهی مسئله تهدید آمیز برای میلیون‌ها نفر درسراسرجهان هستند. مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان داده که میان بیماری‌های ناشی از غذا در انسان و مصرف غذاهای نیم پز تهیه شده از گوشت ارتباط تنگاتنگی وجود دارد. Kristich et al. (2004). با توجه به مشکلات ناشی از جوامع صنعتی و پیامدهای شغلی حاصل از آن و علاقه مردم به استفاده از غذاهای آماده مصرف نظیر فرآورده‌های گوشتی (همبرگر، سوسیس و کالباس) در رفع کمبود مواد پروتئینی و با در نظر گرفتن این که این فرآورده‌های گوشتی ارزان‌تر و راحت‌تر از گوشت خالص می‌باشد میزان مصرف آن‌ها در کشور ما طی دهه گذشته چندین برابر شده است. نظر به استفاده روز افزون مردم از همبرگر و با توجه به استفاده از گوشت گرم در تهیه همبرگر و تبلیغ مصرف آن خطر احتمالی مسمومیت غذایی و امکان آلودگی این محصول به عمده‌ترین باکتری‌های مولد مسمومیت غذایی بالاست

Medeiros et al., 2014; Morandi et al., 2006;) Ogier and Serror., 2008). طی مطالعات انجام شده، *انتروکوک*‌ها و *کلی فرم*‌ها به‌عنوان دوشاخص مهم بهداشتی مطرح هستند. *انتروکوک*‌ها نسبت به کلی فرم‌ها شاخص بهتری در مورد غذاهای یخ زده و منجمد می‌باشند. تراکم بیش از حد مجاز آن‌ها در مواد غذایی بیانگر وضعیت نامطلوب بهداشتی است (Semedo et al., 2003). تحقیق حاضر به‌منظور بررسی میزان آلودگی همبرگرهای عرضه شده به بازار مصرف شهرکرد به باکتری *انتروکوکوس فکالیس* و بررسی فراوانی فاکتورهای ویرولانس صورت گرفت. آلودگی همبرگرهای عرضه شده به بازار مصرف شهرکرد ۶۶ درصد گزارش گردید. به‌طوری‌که در برند شماره ۱ آلودگی به *انتروکوکوس فکالیس* ۱۰۰ درصد در برند شماره ۵، شماره ۹ و شماره ۸، ۸۰ درصد، شماره ۳، ۶۰ درصد، شماره ۴، شماره ۶ و شماره ۷ آلودگی ۲۰ درصد گزارش گردید. در تجزیه‌ی تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر ارتباط معنی‌داری بین آلودگی به *انتروکوکوس فکالیس* و نوع همبرگر مشاهده گردید که مشخص می‌گردد با افزایش درصد گوشت درصد آلودگی بیشتر می‌شود.

بررسی و جداسازی *انتروکوک*‌ها به‌عنوان یکی از شاخص‌های بهداشتی در سایر مواد غذایی غیر از لبنیات نیز گزارش شده است. ازآن جمله در طی تحقیقی توسط کلومن[17] و همکاران در ترکیه با بررسی ۲۰۰ نمونه مختلف مواد غذایی شامل انواع گوشت گاو، ماهی وطیور، همبرگر، پیتزا، ناگت مرغ، استیک گاوی، سالاد وانواع ادویه‌ها درطی یک سال آلودگی ۵۰ درصدی به *انتروکوک*‌ها گزارش گردید (Koluman et al., 2009). به‌همین ترتیب باربوسا[18] و همکاران درشمال پرتقال نیز جداسازی ۱۸۲ ایزوله *انتروکوک* از فرآورده های گوشتی تخمیری سنتی را گزارش نمودند که بیشترین ایزوله هابه ترتیب مربوط به *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* بودند (Barbosa et al., 2010). در این مقالات، به عدم رعایت صحیح اصول بهداشتی در مراحل مختلف تولید تا عرضه ازجمله آلودگی تجهیزات، ظروف و پایین بودن بهداشت فردی پرسنل مرتبط اشاره شده است. در مورد فراوانی فاکتورهای ویرولانس در ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس* تحقیقات متعددی صورت گرفته است. درتحقیق انجام شده توسط قاسمی و همکاران که به‌منظور بررسی فاکتورهای ویرولانس *انتروکوکوس فکالیس*جدا شده از نمونه‌های ادرار صورت گرفت، تولید بیوفیلم شدید و متوسط در ۱۶/۸٪، ژلاتیناز در۲۰ ٪ و همولیزین در ۴۴/۲٪ ازسویه‌ها گزارش گردید. (قاسمی و همکاران ۱۳۸۷).

بتینکورت و سوارتز [19]در سال ۲۰۰۴ در مطالعه‌ای که بر روی ۹۵ ایزوله *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از موارد کلینیکی انجام دادند ۹ ژن *aggA*، *cylA*، *cylB*، *cylM*، *esp*، *eep*، *efaA*، *enlA* و*gelE* را به‌وسیله PCR بررسی نمودند. آن‌ها بیان کردند که توزیع بسیار گسترده‌ای از ژن‌های حدت میان ایزوله‌های مورد بررسی وجود دارد. در ایزوله‌های مورد بررسی فراوانی ژن *efaA* (۵۸/۹٪)، *eep* (۵۸/۹٪)، *esp* (۵۷/۹٪) بیان شد در حالی‌که مارکرهای دیگر حدت با درصد متغیری از ۹/۵ تا ۴۵٪ شناسایی شدند. حضور هم زمان فاکتورهای حدت مختلف در میان سویه‌های بالینی بدون در نظر گرفتن منابع آن‌ها مشاهده شد (Bittencourt et al., 2004). در مطالعه انجام شده توسط ایتون و گاسون[20] در سال ۲۰۰۱ که به‌منظور بررسی عوامل حدت در نمونه‌های غذایی و ایزوله‌های بالینی *انتروووکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* صورت گرفت، الگوهای متفاوت و متمایزی از بروز عوامل حدت در این سویه‌ها یافت شد. این محققان دریافتند در اغلب موارد فراوانی فاکتورهای ویرولانس در *انتروکوک*‌های جدا شده از موارد کلینیکی نسبت به سویه‌های جدا شده از مواد غذایی بیشتر می‌باشد (Eton

[17] - Koluman
[18] - Barbosa
[19] - Bittencourt and Suzart
[20] - Eaton and Gasson

and Gasson., 2001). نتایج Seno وهمکاران نشان داد که بین وجود پروتئین سطحی(*esp*) *انتروکوک*، ژلاتیناز و توانایی سویه‌ها در تشکیل بیوفیلم در شرایط آزمایشگاهی ارتباط قوی وجود دارد (Seno et al., 2005).

در تحقیق انجام شده توسط باربوسا و همکاران که بر روی *انتروکوک‌های* جدا شده از گوشت‌های تخمیری سنتی در شمال پرتقال صورت گرفت، ۷۶ ایزوله *انتروکوکوس فکالیس*، ۴۴ ایزوله *انتروکوکوس فاسیوم* و ۶۲ ایزوله از *انتروکوک*‌های دیگر جداسازی گردید. در این تحقیق فراوانی ژن *efaA*۱۰۰درصد، فراوانی ژن *efaAfm* ۲/۶ درصد ، فراوانی ژن *esp*۳/۹ درصد، فراوانی ژن *agg* ۶۹/۷ درصد، فراوانی ژن *cylM* ۳/۹ درصد، فراوانی ژن *cylB* ۹ /۳ درصد، فراوانی ژن *cylA* ۳/۹ درصد و فراوانی ژن *gelE*۶۷/۱ درصد گزارش گردید (Barbosa et al., 2010). از نظر فراوانی عوامل حدت در تحقیق ما با تحقیق مذکور تفاوت‌هایی ملاحظه می‌گردد به‌طوری‌که در تحقیق ما فراوانی ژن‌های *cylM* و*cyl B* در هیچ ایزوله-ایی مشاهده نگردید ولی در تحقیق مذکور این ژن‌ها از فراوانی ۳/۹ درصد برخوردار بودند. سمدو[21] و همکارانش در سال ۲۰۰۳ بیان کردند فرکانس ژن *cylA* در *انتروکوکسی* بسیار متغیر است و با نمونه‌های بالینی یا نمونه‌های جدا شده از مواد غذایی ارتباطی ندارد (Semdo et al., 2003).

در مطالعه‌ای که مدیروز[22] و همکارانش در سال ۲۰۱۴ بر روی تشخیص مولکولی فاکتورهای ویرولانس *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از نمونه‌های مواد غذایی و بالینی داشتند بیان کردند که در سویه‌های بالینی، نسبت به ایزوله‌های مواد غذایی، شیوع ژن‌های ویرولانس *agg*، *esp* ، *cylA* بیشتر بوده و ژن *esp* تنها در سویه‌های بالینی یافت شده است. در صورتی‌که در تحقیق ما ژن *esp* از فراوانی ۶ درصد برخوردار می‌باشد. به‌نظر می‌رسد که عدم رعایت بهداشت فردی و انتقال باکتری از افراد دخیل در تهیه همبرگر به محصول علت این امر باشد.

فعالیت ژلاتیناز و بتا همولیزین با حضور ژن‌های *gelE* و*cylA* ثابت شد. حضور بعضی از ژن‌های ویرولانس در سویه‌های کلینیکی به‌صورت ۱۰۰درصد و در مواد غذایی به‌میزان کمتر گزارش شده است. نتایج حاصل از تجزیه تحلیل آماری نشان داد که ایزوله‌های جداشده بالینی و غذایی دارای الگوهای متفاوتی از فاکتورهای ویرولانس می‌باشند (Modeiros et al., 2014).

نتیجه گیری کلی

انتروکوک‌ها وکلی فرم‌ها به‌عنوان دو شاخص مهم بهداشتی مطرح هستند. با توجه به 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 تحقیق نشان دهنده آلودگی زیاد همبرگرهای عرضه شده در شهرستان شهرکرد می‌باشد و از آن‌جا که همبرگر از جمله محصولاتی است که به‌صورت دست ساز و به‌طورگسترده توسط اقشار مختلف مردم استفاده می‌شود، آلودگی بالای همبرگر می‌تواند باعث مسمومیت‌های غذایی در مصرف کنندگان گردد. خوشبختانه مطالعات مختلف حاکی از آن است که حضور ژن‌های ویرولانس در مواد غذایی به میزان کمتری از نمونه‌های کلینیکی می‌باشدکه در تحقیق حاضر نیز چنین نتیجه‌ای حاصل شد.

حمایت مالی

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

تضاد منافع

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

[21] - Smedo
[22]- Medeiros

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

منابع

۱. رسولی پیروزیان، هانیه.، حصاری، جواد.، فرج نیا، صفرنیا.، مقدم، محمد و قیاسی فر، شیوا. (۱۳۸۷). جداسازی و شناسایی سویه‌های انتروکوکسی غالب در پنیر سنتی لیقوان. مقاله هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی.

۲. قاسمی، احمد.، منیری، رضوان.، خورشیدی، احمدو موسوی سید غلامعباس. (۱۳۸۷). بررسی فاکتورهای ویرولانس *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از نمونه‌های ادرار. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران. شماره‌های ۲ و ۳. صفحه ۵۸-۵۳.

۳. میرحسینی، محبوبه. (۱۳۹۱). شناسایی *انتروکوکوس* تولید کننده باکتریوسین در محصولات لبنی به وسیله PCR، مجله زیست شناسی ایران. شماره ۳، صفحه ۳۵۷-۳۵۱.

4. Barbosa, J., Gibbs, P.A., Teixeira, P. 2010. Virulence factors among *enterococci* isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. Food Cont. 21: 651-656.

5.Bittencourt, M.E., and Suzart, S. 2004. Occurrence of virulence associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, J Med Microbiol. 53: 1069-1080.

6. Chow, J.W., ThalL, A., Perri, M.B., Vazquez, J.A., Donabedian, S.M., Clewell, D.B., Zervos, M.J. 2003. Plasmid associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental *entrococcal* endocarditis. Antimicrob Agents Chemother. 37: 2474-2477

7. Cosentino, S., Podda, G.S., Corda, A., Fadda, M.E., Deplano, M., Pisano, M.B. 2010. Molecular detection of virulence factors and antibiotic resistance pattern in clinical *Enterococcus faecalis* strains in Sardinia. J Prev Med Hygyene. 51: 31-36.

8.Coque, T., Patterson, T., Steckelberg, J., Murray, E. 1994. Incidence of hemolysin, gelatinase and aggregative substance among *enterococci* isolates from patients with endocarditic and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. J Infect Dis. 171: 1223-1229.

9. Eaton, T.J., and Gasson, M.J. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Applied Env Microbiol. 67: 1628-1635.

10. Feglo, P., and Sakyi, K. 2012. Bacterial contamination of street vending food in Kumasi, Ghana. J Med Biomed Sci. 1: 1-8.

11. Fukushima, H. 1997. Introduction into Japan of pathogenic *Yersinia* through imported pork, beef and fowl. Int J Food Microbiol. 35: 205-212.

12. Hurlbert, R.E. 1998. Microbiology Laboratory Manual. 2nd ed. USA; Washington State University. 11-15.

13.Huycke, M.N., Sahm, D.F., Gilmore, MS.1998. Multiple- drug resistant *enterococci*: The nature of the problem and an agenda for the future. Emerg Infect Dis. 4: 249-239.

14. Jett, B.D., Huycke, M.M., Gilmore, M.S. 1994. Virulence of *Enterococci*. Clin Microbiol Rev. ; 7: 462-478

15. Koluman, A., Akan, L.S., Çakiroğlu, F.P. 2009. Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. Food Cont. 20: 281-283.

16. Kristich, C.J, Li, Y.H., Cvitkovitch, D.G., Dunny, G.M. 2004. Esp independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. J Bacteriol. 186: 154-163.

17. Medeiros, A.W., Pereira, R.I., Oliveira, D.V., Martins, P.D., d'Azevedo, P.A., Van der Sand, J.S. 2014. Molecular detection of virulence factors among food and clinical

Enterococcus faecalis strains in South Brazil. Braz J Microbiol. l45: 327–332
18. Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lodi, R. 2006. Technological and molecular characterization of *Enterococci* isolated from north-west Italian dairy products. Int Dairy J. 16: 875-867.
19. Ogier, J.C., Serror, P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. Int J Food Microbiol. 126: 301-291.
20. Semedo, T., Santos, M.A., Lopes, M.F., Figueiredo Marques, J.J., Barreto Crespo, M.T., Tenreiro R. 2003. Virulence factors in food, clinical and reference *Enterococci*: A common trait in the genus? Systematic Applied Microbiol. 26: 13-22.
21. Seno, Y., Kariyama, R., Mitsuhata, R., Monden, K., Kumon, H. 2005. Clinical implications of biofilm Formation by *Entrococcus faecalis* in the uurinary tract. Acta Med Okayama. 59: 79 -87.
22.Vergis, EN., Shankar, N., Chow, J.W., Hayden, M.K., Snydman, D.R., Zervos, M.J. 2002. Association between the presence of *enterococcal* virulence factors gelatinase, hemolysin, and *enterococcal* surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. Clin Infect Dis. 35: 570-575.

Prevalence of virulence factors in *Enterococus faecalis* isolated from Hamburger

Mehdeyan R[1], Tajbakhsh E[2], Bamzadeh Z[2]

1. Graduated of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord-Iran.
2. Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord-Iran.

***Corresponding author:** *ee_tajbakhsh@yahoo.com*

Received: December 19, 2020 Accepted: March 19, 2021

Abstract

Enterococci are microorganisms that are mainly found in the intestines. Their high presence in food can cause fecal contamination, and they are isolated from various foods such as vegetables, meat, etc. Among the food, a hamburger is one of the products used by hand and widely by people. In this study, 50 hamburger samples were examined for biochemical and molecular methods for the presence of *Enterococcus faecalis*. A PCR reaction temperature program was performed to detect virulence genes in the fact of specific primer pairs. In this study, out of 50 samples, 33 samples (66%) were infected with *E. faecalis*. Of 33 *E. faecalis* isolates isolated from hamburgers, *efaA* was reported in 8 isolates (24.24%), *cylA* was reported in 15 isolates (45.45%), *gel E* was reported in 9 isolates (27.27%), *esp* reported in 2 isolates (6.06%), *agg* reported in 2 isolates (6.06%), *and aca*, *asa*, *and cyl B* were not observed in any of the isolates. Enterococci and coliforms are considered two essential health indicators. Considering that the high presence of enterococci in food can be a reason for fecal contamination, the results of this study indicate the high contamination of burgers offered in Shahrekord city.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, hamburger, virulence genes.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited

Copyright © 2021 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.