Archive of SID

ORIGINAL ARTICLE

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

Mohammad Reza Arabestani[1],
Hamed Tahmasebi[2],
Behroz Zeyni[3]

[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)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:39 +0430 on Wednesday May 31st 2017

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

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26 (145): 234-247 (Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:39 +0430 on Wednesday May 31st 2017

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۵ بهمن سال ۱۳۹۵ (۲۴۷-۲۳۴)

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

محمدرضا عربستانی[۱]
حامد طهماسبی[۲]
بهروز زینی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: *انتروکوکوس‌ها* می‌توانند سبب آلوده شدن فرآورده ای غذایی شوند. هدف از این پژوهش، جداسازی گونه‌های مختلف *انتروکوکوس* بر اساس روش Melting Curve Analyzing مبتنی بر Real time PCR در نمونه‌های مواد غذایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۱۳۸ نمونه مختلف (گوشت مرغ، گوشت قرمز، شیر، پنیر) آلوده به گونه‌های مختلف انتروکوک از مجموع ۵۱۰ نمونه مورد بررسی از سطح شهر جمع‌آوری شد. شناسایی گونه‌های مختلف *انتروکوکوس* با هدف قرار دادن سایت‌های انحصاری در گونه‌های مختلف و طراحی پرایمرهای اختصاصی برای این نواحی بر اساس روشMelting Curve Analizing مبتنی بر Real time PCR صورت گرفت.

یافته‌ها: بر اساس آنالیز منحنی‌های ذوب به روش Real Time PCR، ۸۴ ایزوله (۶۰/۸۶ درصد) انتروکوکوس فکالیس، 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 ایزوله‌های انتروکوک به دست آمده مربوط به نمونه‌های گوشت مرغ با ۲۹ نمونه (۲۴/۶۳ درصد) و گوشت قرمز با ۲۱ نمونه (۵۱/۴۴ درصد) بود. هم‌چنین با قرار دادن نتایج حاصل از تعیین توالی آزمون PCR به عنوان شاخص استاندارد، حساسیت و ویژگی روش فنوتیپی برای انتروکوکوس فکالیس 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 معنی‌داری بین نوع نمونه و پراکنش گونه‌های انتروکوکوس مشاهده شد ($p\leq ۰/۰۵$).

استنتاج: باتوجه به گستردگی و خطاپذیر بودن روشهای فنوتیپی در تعیین گونه *انتروکوکوس‌ها* ، و حسایت 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

غذاهای مختلف، امکان انتقال بسیاری از پاتوژن‌های مفید و مضر از جمله باکتری‌ها را به بدن انسان فراهم می‌سازد(۱). مصرف باقیمانده‌های مواد دارویی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها توسط انسان از طریق زنجیره

مولف مسئول: بهروز زینی– همدان: دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی E-mail:b.zeyni.umsha@gmail.com
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

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:39 +0430 on Wednesday May 31st 2017

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). *انتروکوک‌ها* (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 موادغذایی وجود دارند. از ویژگی‌های این گروه از باکتری‌ها می‌توان به رشد در ۱۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد درمحیط‌هایی با غلظت نمکی بالا و در گستره وسیعی از PH اشاره کرد. به‌علاوه انتروکوک‌ها دارای توانایی اکتساب فاکتورهای مقاومت دارویی متعددی هستند که مشکلات جدی در کنترل و مراقبت بیماران مبتلا به عفونت‌های انتروکوکی ایجاد می‌نمایند(۴). این میکروارگانیسم‌ها سومین علت معمول باکتریایی کسب شده در بیمارستان‌ها هستند. از بیست گونه *انتروکوکی* 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(۶،۵) 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 فراوری 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 انتروکوک 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 انتروکوک که وابسته به روش‌های مبتنی بر کشت و بیوشمیایی است، به دلیل وقت گیر 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 انتروکوک، زمانی اهمیت ویژه‌ای پیدا می‌کند که سویه‌های مختلفی که به طیف گسترده‌ای آنتی‌بیوتیک ها مقاوم هستند، مد نظر باشند(۱۱). در برخی روش‌های مولکولی، با هدف قرار دادن ژن های اختصاصی در باکتری و طراحی پرایمر، می توان 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 بیوسنتز 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 انتروکوک و گونه‌های مرتبط با آن در کنار

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:39 +0430 on Wednesday May 31st 2017

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 *انتروکوکوس* ها، از سرعت نامناسب و ارزش اخباری غیرقابل اطمینانی بر خوردار هستند(۹). در بسیاری از موارد، تشخیص جنس و گونه‌های انتروکوک 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 انتروکوک، 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 gallinarum*) مقاومت سطح پایین به ونکومایسن را سبب می‌شود. در گونه‌های *انتروکوکوس کاسلی فلاووس* (*Enterococcus.casseliflavus*) و *آویوم* (*Enterococcus avium*) نیز ژن‌های *elongation factor Tu* (*tuf*) و *16S* دارای عملکرهای 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 درکنار 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 *انتروکوکوس‌های* جدا شده از نمونه‌های مواد غذایی و گوشت می‌باشد.

مواد و روش ها

جمع آوری 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 میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان منتقل شد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:39 +0430 on Wednesday May 31st 2017

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

با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی، سوش‌های 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 کانامایسین اسکولین آزید آگار (kanamycin aesculin agar) (شرکت مرک، آلمان) به عنوان مناسبترین محیط کشت برای شناسایی استفاده شد(۱۳). برای تعیین هویت گونه‌های انتروکوکوس با استفاده از روش‌های استاندارد میکروبشناسی، مورفولوژی کلنی، با استفاده از ویژگی‌های بیوشیمیایی متداول از جمله هیدرولیز اسکولین درحضور صفرا، رشد در حضور ۶/۵NaCl درصد، فعالیت پیرولیدونیل آریل آمیداز (PYR) انجام شد. هم‌چنین از آزمون‌های مبتنی بر تخمیر قندها (آرابینوز، مانیتول، سوربیتول، سوربوز، لاکتوز) در لوله‌های حاوی محیط پایه قندی به نسبت ۱ درصد از قندهای ذکر شده و انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد(۱۵،۱۴).

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 به‌مدت 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 موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ ND-1000 (USA,BioRad) تعیین گردید(۱۳).

طراحی پرایمرهای اختصاصی برای گونه‌های مختلف انتروکوکوس

جهت طراحی پرایمرهای اختصاصی، سایت‌های هدف در گونه‌های مختلف انتروکوکوس مورد استفاده قرار گرفت. سایت‌های هدف انتخاب شده برای پرایمر انتروکوکوس گالیناروم ژن *vanC*، برای انتروکوکوس کاسلی فلاووس (*Enterococcus.casseliflavus*) ژن *EF-TU*، برای انتروکوکوس آویوم ژن *16S*، 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 نرم‌افزار 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 نمونه‌های انسانی، قارچی، ویروس‌ها و میکروارگانیسم‌های دیگر صورت پذیرفت (جدول شماره ۱).

تعیین توالی محصولات پرایمرهای طراحی شده

جهت تعیین آزمون استاندارد به منظور مقایسه حساسیت و ویژگی روش‌های کشت و مولکولی و هم‌چنین

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

باکتری مورد مطالعه	ژن های مورد نظر	طول توالی	اندازه (bp)	رفرنس
انتروکوکوس فکالیس	*F.divIVA* *R.divIVA*	F: ACGTGTCTTCCATCAACGCT R: ACTGCTGTATGTTTGTCTCCGA	۱۲۳	این مطالعه
انتروکوکوس فاسیوم	*F.Alanine racemase* *R. Alanine racemase*	F: ATCCCTCTGGGCACGCAC R: ACATACACGCCCAATCGTTTC	۲۴۸	این مطالعه
انتروکوکوس گالیناروم	*vanC-F* *vanC-R*	AGCAATAAATCTTTGTGGGTTCGT ATTTGCGGCAATGAAAGACAG	۱۵۸	این مطالعه
انتروکوکوس کاسلی فلاووس	*EF-tu-F* *EF-tu-R*	TTTTCGATCACAGGACGGGG GTTATCGCCAGCTTCTCCGA	۱۷۱	این مطالعه
انتروکوکوس آویوم	*16s-F* *16s-R*	GTTTCGGTTTGAAAGGCGCT TGTCTCAGTCCCAATGTGGC	۱۳۸	این مطالعه

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:39 +0430 on Wednesday May 31st 2017

اطمینـان از عـدم همولـوژی و مکمـل بـودن تـوالی پرایمرهـا بـا تـوالی‌هـای نوکلئوتیـدی در بخـش‌هـای دیگر ژنوم، آزمـون PCR جهـت تکثیـر ژن‌هـای هـدف در گونه‌هـای مـورد مطالعـه تاییـد شـده از نظـر فنـوتیپی انجام گرفت. محصـولات بـه دسـت آمـده بـرای تعیـین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شـدند. در نهایـت نتایج حاصل از تعیین توالی‌های طراحی شده در قسـمت BLAST پایگـاه NCBI tool Search BLAST بـه آدرس http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast بررسـی شدند.

شناسایی گونه های مختلف انتروکوکوس به واسطه PCR

جهت انجام واکنش PCR بـرای هـر نمونـه بـه ایـن صورت عمل شد: ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شـده بـه همراه ۱۲ میکرولیتر از مستر میکس قرمـز (Ampliqon آلمـــان) (شـــامل Tris-Hcl PH8.5، (NH4)SO4، 3mMMgcl2، 0/2%Tween 20، MmdNTP 4/4، unit Ampliqon polymeras 0/2، Insert red dye and stabilizer) و ۱ میکرولیـت از هـر پرایمـر بـه غلظـت ۱۰ پیکومـولار داخـل میکروتیـوب‌هـای ۰/۲ RNAas/DNAas Free (BioFil کـره جنـوبی) ریختـه شد و برای رساندن حجم نهایی بـه ۲۵ میکرولیتـر بـه آن آب مقطر اضافه گردید. برای تکثیر ژن‌های مورد نظر از دستگاه ترموسایکلر Eppendorf (کشور آلمان) با تنظیمات سـیکل دمـایی بـه صـورت شـوک حرارتـی ۹۴ درجـه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، و تعـداد ۲۵ سـیکل بـه صـورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سـانتی‌گـراد ۳۰ ثانیـه اعمال شد. دمای انلینـگ بـرای ژن *Alanine racemase* ۵۷ درجـه سـانتی‌گـراد، بـرای ژن *divIVA* ۵۹ درجـه سـانتی‌گـراد و بـرای ژن‌هـای *vanC*، *EF-tu* و *16s* ۵۸ *درجه سانتی‌گراد* هر کدام به مدت ۶۰ ثانیـه تعیـین شـد. طویل شدن نهایی هم در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه در نظر گرفته شد.

الکتروفورز محصولات حاصل از PCR

محـصولات PCR توسـط الکتروفـورز بـا اسـتفاده از ژل ۱/۵ درصـد آگـارز از یکـدیگر جـدا شـدند؛ بـه ایـن صورت که ۵ میکرولیتر از محصـول نهـایی PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر ۰/۵X الکتروفـورز گردیـد. بـرای رنگ دهی به ژل، به آن ۴ میکرولیتـر محلـول Gel Red (Biotium آمریکـا) اضـافه و خـوب مخلـوط گردیـد. بـرای تعیـین انـدازه محصـولات از نـشانگر (Marker) مولکـولی فرمنتاز (Thermofisher دانمـارک) بـا تـوالی ۱۰۰ جفت بازی استفاده شـد. در نهایـت از ژل حاصـل توسط دستگاه ژل داک عکسبرداری شد.

شناسایـی گونه‌های مختلف انتروکوکـوس به واسطـه Real time PCR

جهـت انجـام واکـنش Real time از دسـتگاه ABI one plus (آمریکا) استفاده شـد. تنظیمـات دمـایی دستگاه به صورت زیر اعمال شد. مرحلـه اول کـه منجـر به دناتوره شدن DNA الگو و فعال شدن آنـزیم پلیمـراز می‌گردد، در دمای ۹۵ درجه سـانتی‌گـراد و بـه مـدت ۵ دقیقـه انجـام گرفـت. در مرحلـه دوم، واکـنش تکثیـری DNA در ۴۰ سیکل و با دمای ۹۵ درجه سـانتی‌گـراد بـه مدت ۱۵ ثانیه و دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیـه ادامـه یافـت. مرحلـه پایـانی جهـت ترسـیم منحنـی تفکیک یا منحنی ذوب به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گـراد بـه مـدت ۱۵ ثانیـه، ۵۵ درجـه سـانتی‌گـراد بـه مـدت ۱ دقیقه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مـدت ۱۵ ثانیـه انجـام شـد. واکـنش‌هـای Real time PCR در حجـم نهـایی ۲۰ میکرولیتـر بـه صـورت دوتـایی در پلیـت‌هـای ۹۶ چـاهکی انجـام شـدند. مخلـوط واکـنش شـامل (TaKaRa,Japan) Mix Master PCR SYBR Green بـه میـزان ۱۰ میکرولیتـر، ۱ میکرولیتـر (غلظـت ۱۰ پیکومولار) از پرایمرهای مستقیم و معکـوس، ۵ میکرولیتـر DNA الگو، ۰/۴ میکرولیتـر رنـگ Rox و بقیـه آن آب

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:39 +0430 on Wednesday May 31st 2017

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 10^1 تا 10^6 باکتری شد و به صورت سه تایی (Triplicate) در سه روز متوالی برای رقت‌های تهیه شده آزمون Real Time PCR انجام شد و با استفاده از تکرارپذیری تست انجام شده، حساسیت آزمون طراحی شده به دست آمد. هم‌چنین به منظور انجام آزمون اختصاصیت پرایمرهای تهیه شده از سویه DNA سویه استاندارد *Enterococcus faecalis ATCC 29212* به عنوان کنترل مثبت و از DNA *Escherichia coli ATCC 25922* و *Staphylococcus aureus ATCC 29213* به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای جداسازی گونه‌های مختلف انتروک 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 گونه‌های مختلف از نرم افزار Chromas نسخه ۲,۵۱ استفاده شد. تحلیل داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS (IBM آمریکا)، انجام شد. حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری منفی و ارزش اخباری مثبت روش‌های فنوتیپی و Real time PCR جهت تعیین گونه‌های مختلف انتروکوکوس با استفاده از تحلیل‌های آماری صورت‌گرفت. در این بررسی نتایج به‌دست آمده از تعیین توالی تست مولکولی PCR به عنوان شاخص استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. جهت بررسی ارتباط معنی‌دار بودن داده‌های به‌دست آمده نیز از آزمون آماری Chi-squver با ضریب اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد ($p < ۰/۰۵$).

یافته ها

در تست‌های اولیه فنوتیپی انجام شده جهت تشخیص اولیه گونه‌های 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 گونه‌های مختلف انتروکوکوس در نمونه‌های 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 بیش‌ترین نمونه‌های انتروکوکوس فکالیس از گوشت قرمز و گوش سفید جداسازی شد (جدول شماره ۲). برای تعیین حساسیت پرایمرهای طراحی شده و مشخص کردن توانایی آن‌ها در شناسایی سایت‌های انحصاری مورد هدف درگونه‌های مختلف انتروکوکوس، رقت‌های مختلف DNA به همراه پرایمرهای مورد نظر، توسط تکنیک Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت تکثیر رقت‌های حاصل از تکثیر ژن‌های مورد مطالعه در باکتری‌های *انتروکوکوس فکالیس*، *انتروکوکوس فاسیوم*، *انتروکوکوس گالیناروم*، *انتروکوکوس آویوم* و *انتروکوکوس کاسلی فلاووس* به صورت منحنی‌های ذوب به دست آمد. نتایج حاصل از منحنی‌های ذوب نشان‌دهنده همپوشانی کامل واکنش‌های 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 رقت‌ها دمای ۷۶/۶ درجه سانتی گراد و منحنی‌های حاصل از تکثیر ژن *Alanine racemase* در انتروکوکوس فاسیوم دمای ۸۰/۹۳ درجه سانتی گراد، منحنی‌های

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:39 +0430 on Wednesday May 31st 2017

حاصل از تکثیر ژن *EF-tu* در انتروکوکوس کاسلی فلاووس دمای ۸۲/۹ درجه سانتی‌گراد، منحنی‌های حاصل از تکثیر ژن *vanC* در انتروکوکوس گالیناروم دمای ۷۹/۱ درجه سانتی‌گراد و منحنی‌های حاصل از تکثیر ژن *16S* در انتروکوکوس آویوم دمای ۸۵/۱ درجه سانتی‌گراد را نشان داد (نمودار شماره ۱) (جدول شماره ۲). تحلیل منحنی‌های آستانه مربوط به ژن‌های گونه‌ای مختلف انتروکوکوس، نشان‌دهنده شروع موفق همانندسازی در سیکل های مختلف در همه رقت‌های تهیه شده بود (نمودار شماره ۱). با به دست آوردن غلظت در رقت‌های 10^{1} تا 10^{7} 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 DNAهای گونه‌های 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 مربوط به تکثیر موفقیت‌آمیز ژن *divIVA* انتروکوکوس فکالیس، طول ۲۴۸ جفت باز مربوط به تکثیر موفقیت‌آمیز ژن *Alanine racemase* انتروکوکوس فاسیوم، طول ۱۵۸ جفت باز مربوط به تکثیر موفقیت‌آمیز 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 ۱۶ S در انتروکوکوس اویوم و ژن EF-tu در انتروکوکوس کاسلی فلاووس* (*Enterococcus.casseliflavus*) نشان‌دهنده عدم همولوژی پرایمرهای طراحی شده با باکتری‌های دیگر بود (تصویر شماره ۱). هم‌چنین نتایج هم ترازبندی نشان‌دهنده حساسیت و اختصاصیت بسیار مناسب برای شناسایی باکتری‌های مورد مطالعه بودند.

با استفاده تعیین مقادیر P-Value برای گونه‌های مختلف، مقادیر به دست آمده برای وجود یا عدم وجود ارتباط بین پراکنش گونه‌های 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 هم‌چنین برای تعیین اختصاصیت پرایمرهای انتروکوکوس فاسیوم از باکتری اشریشیاکلی استفاده شد. دماهای به دست آمده در پایان واکنش و منحنی‌های ایجاد شده، نشان‌دهنده عدم شناسایی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه برای سایر باکتری بود (جدول شماره ۳).

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

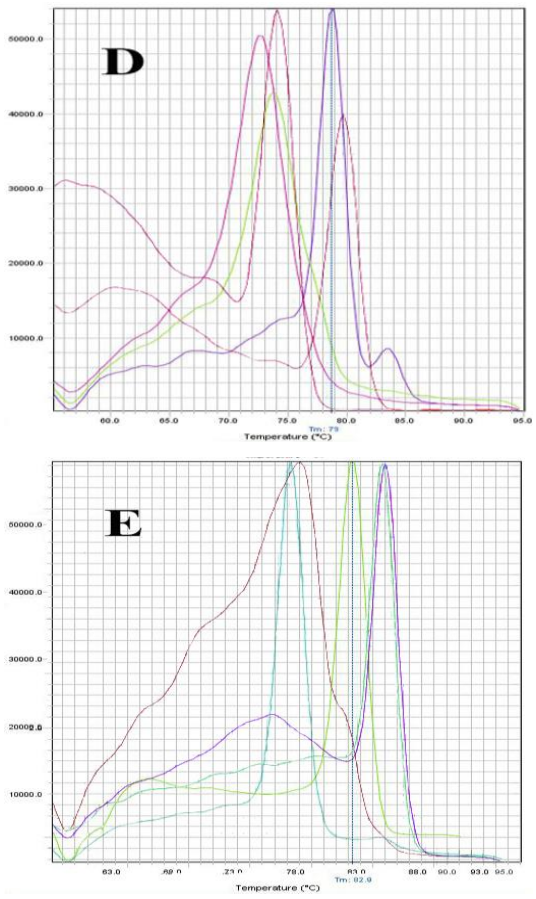
نمونه های غذایی	گونه های مختلف انتروکوکوس (n=۱۳۸)										P. Value (P≤0/05)
	انتروکوکوس فکالیس (n=۸۴)		انتروکوکوس فاسیوم (n=۴۸)		انتروکوکوس گالیناروم (n=۱)		انتروکوکوس آویوم (n=۴)		انتروکوکوس کاسلی فلاووس (n=۱)		
	فنوتیپی مثبت	ژنوتیپی مثبت	فنوتیپی مثبت	ژنوتیپی مثبت	فنوتیپی مثبت	ژنوتیپی مثبت	فنوتیپی مثبت	ژنوتیپی مثبت	فنوتیپی مثبت	ژنوتیپی مثبت	
پنیر	۹	۹	۴	۴	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰/۰۳۳۱
گوشت مرغ	۲۹	۱۴	۲۲	۲۲	۲	۱	۲	۰	۲	۱	۰/۰۱۲۱
گوشت قرمز	۴۱	۴۱	۱۹	۱۹	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰/۰۱۵۹
شیر	۱۰	۰	۱	۱	۰	۱	۲	۱	۰	۰	۰/۰۴۹۱

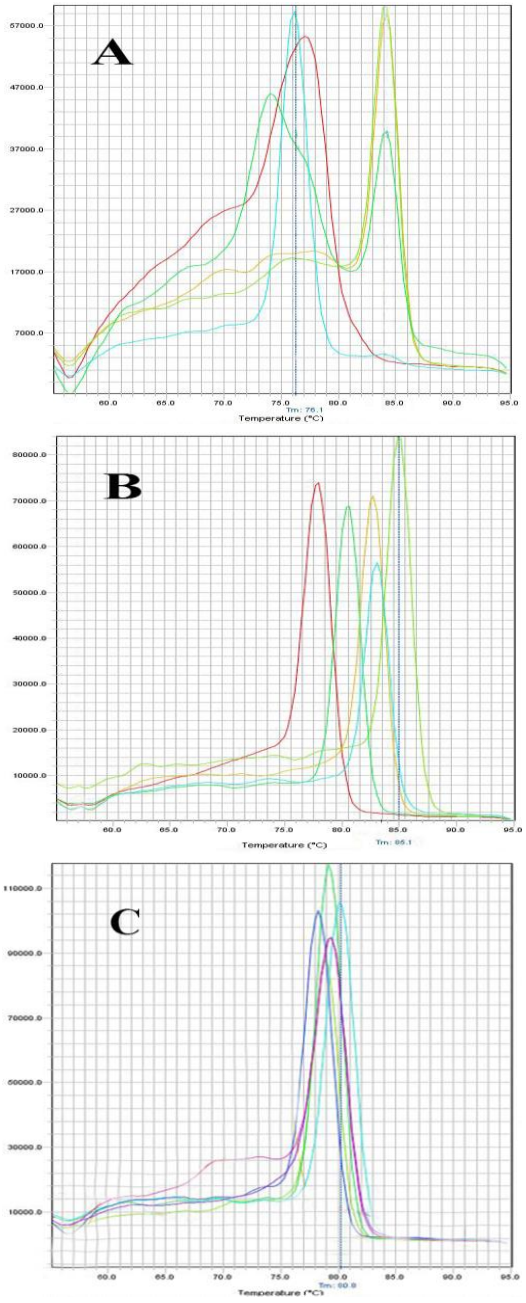
www.SID.ir

Archive of SID

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

باکتری مورد مطالعه		غلظت و OD های به دست آمده در رقت های متفاوت							
		استوک	10^{7}	10^{6}	10^{5}	10^{4}	10^{3}	10^{2}	10^{1}
انتروکوکوس فکالیس	OD	۲/۳	۴/۰۹	۱/۳	۱/۱	۱/۴	۰/۸	۰/۶	۰/۱
	Con	۸ng	۰/۷۹ng	۰/۰۷ng	۸/۱۲pg	۰/۷pg	۰/۷۵pg	۰/۰۰۵۷pg	۰/۰۰۰۶pg
انتروکوکوس فاسیوم	OD	۱/۱۴	۲	۰/۹۳	۰/۹	۰/۹۱	۰/۴۸	۱	۰/۷۸
	Con	۵/۶۴ng	۰/۵۳ng	۰/۰۶۱ng	۴/۹pg	۰/۵۱pg	۰/۰۴۲pg	۰/۰۰۰۳pg	۰/۰۰۰۰۳۸pg
انتروکوکوس کاسلی فلاووس	OD	۴/۴	۳/۱	۱/۹	۲/۳	۳/۹	۰/۹۷	۰/۶	۰/۷۹
	Con	۹/۳ng	۱ng	۰/۱۸۱ng	۹/۱pg	۰/۸۵pg	۰/۰۷۹pg	۰/۰۰۰۶۸pg	۰/۰۰۰۰۱۶pg
انتروکوکوس آویوم	OD	۴/۵	۲	۲/۲	۱/۲۹	۱/۸۹	۰/۹۷	۰/۴۹	۰/۷۸
	Con	۵/۳ng	۰/۵۱ng	۰/۰۶۳ng	۵/۹pg	۰/۳۹pg	۰/۰۰۵pg	۰/۰۰۰۴۵pg	۰/۰۰۰۰۳۹pg
انتروکوکوس گالیناروم	OD	۲/۵	۳/۱	۱/۹	۲/۴	۰/۹	۰/۸۳	۰/۹۳	۰/۴۹
	Con	۶/۰۱ng	۰/۷ng	۰/۵۷ng	۴/۹۲pg	۰/۵۷pg	۰/۰۶۵pg	۰/۰۰۶۷pg	۰/۰۰۰۴۲pg





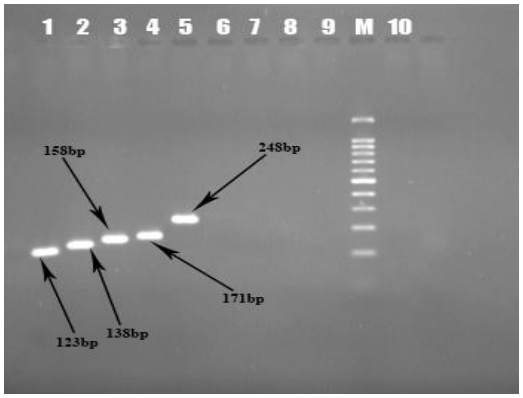
نمودار شماره ۱ : منحنی‌های ذوب Multiplex Real Time حاصل از DNA و پرایمرهای گونه‌های مختلف انتروکوکوس براساس دما (محور افقی) و مشتق سیگنال فلورسنت (محور عمودی). A: انتروکوکوس فکالیس (۷۶/۶ درجه سانتی گراد). B: انتروکوکوس آویوم (۸۵/۱ درجه سانتی گراد). C: انتروکوکوس فاسیوم (۸۰/۸ درجه سانتی گراد). D: انتروکوکوس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

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:39 +0430 on Wednesday May 31st 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:39 +0430 on Wednesday May 31st 2017



تصویر شماره ۱: نتایج الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن های 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. چاهک های ۶،۷،۸،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*: ۶۶/۶۶ درصد، ۹۸/۵۲ درصد، ۶۶/۶۶ 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 آویوم* ۱۰۰ درصد و ۱۰۰ درصد، برای *انتروکوکوس فکالیس* ۹۷/۶۱ درصد و۹۰/۷۴ 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 انتروکوکوس‌ها 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، ۹۵ درصد و برای انتروکوکوس فاسیوم به ترتیب ۸۹/۱۳ درصد، ۹۷/۷۷ درصد، ۹۵/۳۴ درصد و ۹۴/۶۲ درصد به‌دست آمد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:39 +0430 on Wednesday May 31st 2017

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 روش‌های فنوتیپی جهت تشخیص سویه‌های مقاوم این دو گونه مورد ارزیابی قرارگرفت که نتایج آن نشان‌دهنده وجود خطاهای احتمالی در روش‌های فنوتیپی جهت تعیین گونه و سویه‌های یک گونه می‌باشد(۱۱). این امر نشان‌دهنده وجود خطاهای احتمالی در انجام تست‌های فنوتیپی می‌باشد. در استفاده از روش Melting Curve Analyzing که بر اساس تجزیه و تحلیل منحنی حاصل از ذوب DNA می‌باشد، می‌توان خطاهای احتمالی بر اساس تست‌های فنوتیپی را از بین برد. حساسیت این روش ارتباط بسیاری به پرایمرهای طراحی شده و مورد استفاده دارد. حساسیت و ویژگی تست‌های فنوتیپی برای انتروکوکوس‌آویوم 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 روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی ساده ارائه دادند، خطاهای روش‌های فنوتیپی در تعیین گونه و برخی سویه‌های مقاوم را مشاهده کردند. در این بررسی که از PCR معمولی جهت این مقایسه استفاده شده بود، اختلاف حساسیت و ویژگی روش‌ها قابل تامل بود، در حالی که در مطالعه حاضر از روش حساس‌تر و دقیق‌تر Real Time استفاده شده است که در نهایت این اختلاف معنی‌دار را در مورد حساسیت روش‌ها سبب شده است(۱۵).

Woksepp و همکاران در مطالعات خود در سال ۲۰۱۴ از روش آنالیز منحنی ذوب DNA های باکتری‌های مختلف استفاده کردند، دسته‌بندی باکتری مطابق با این روش با بالاترین حساسیت صورت گرفت. در این بررسی، حساسیت این روش در تعیین گونه انتروکوکوس‌ها 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 گونه‌ای 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، نسبتا همخوانی دارد(۱۶). گونه‌های مختلف انتروکوکوس دارای همولوژی نزدیکی به هم هستند. در مطالعه انجام شده توسط ما نیز این مورد در تست‌های فنوتیپی دیده شد، به‌طوری که در ۵ مورد گزارش انتروکوکوس گالیناروم و ۳ مورد گزارش انتروکوکوس آویوم با تست‌های 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 همولوژی‌های نزدیک بین گونه‌ایی وجود داشته باشد، می‌تواند با تکیه بر حساسیت بالای خود، گونه‌هایی 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 گونه‌های 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 پروفایل ذوب را در کنار روش PFGE مورد استفاده قرار گرفت تا حساسیت آن را افزایش دهد(۱۷). این در حالی بود که استفاده از

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:39 +0430 on Wednesday May 31st 2017

روش MCV خود به تنهایی نیز قادر به شناسایی گونه ها نیز می باشد. 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 هموژی‌های مشابه منجر به گزارش‌های منفی کاذب و مثبت کاذب شد(۱۸). علاوه بر این، در مطالعاتی که Pelicioli Riboldi و همکاران در سال ۲۰۰۸ در برزیل انجام دادند، هموژی 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 صرفه‌بودن اهمیت زیادی دارد. در مطالعاتی که Tan و همکاران در سال ۲۰۱۵ در سنگاپور انجام دادند، با پیشنهاد روش Tetraplex eal 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 Multplex(Pantaplex) Real Time PCR انجام شد، از نظر مقرون به صرفه‌بودن 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 ونکومایسین)، نیاز به کنترل بیش‌تر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی در تغذیه حیوانات و بررسی‌های دقیق گونه‌های انتروکوکوس در مواد غذایی توسط روش‌های حساس را بیش 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 ($p\leq$ ۰/۰۵) بین این متغیرها، نشان داد که در نمونه‌های گوشتی اعم از گوشت مرغ و گوشت قرمز، فراوانی گونه‌های مختلف، خصوصا گونه‌های خطرساز 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 دقیق تر 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

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:39 +0430 on Wednesday May 31st 2017

ایزولـه هـای جـدا شـده گونـه‌هـای انتروکـوک از نمونـه‌هـای کلینیکـی و مـواد غـذایی بـر اسـاس روش Melting Curve Analysis در مقطع کارشناسی ارشـد در سال ۱۳۹۴ به شماره ۹۳۱۲۲۶۱۹ است که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همـدان بـه انجام رسیده است. نویسندگان مراتب تشکر و قـدردانی خود را از این معاونت محترم ابراز می‌دارند.

References

1. Bhardwaj A, Malik RK, Chauhan P. Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. Indian J Microbiol. 2008; 48(3): 317-325.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Giraffa G. Enterococci from foods. FEMS Microbiol Rev 2002; 26(2): 163-171.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Tong SY, Giffard PM. Microbiological applications of high-resolution melting analysis. J Clin Microbiol 2012; 50(11): 3418-3421.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:39 +0430 on Wednesday May 31st 2017

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.

www.SID.ir