ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۶، شماره۱، فروردین و اردیبهشت۱۴۰۰(شماره پی در پی ۱۴۴)

# دقت روش REP-PCR در ژنوتایپینگ ایزوله‌های *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده از گوشت قرمز به عنوان عامل عفونت‌های ناشی از غذا

**محمد رضا رادمهر[۱]، خلیل خاشعی ورنامخواستی[۲*]، الهه تاج‌بخش[۱]**

[۱]گروه میکروبیولوژی، واحد شهر کرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران، [۲]گروه ژنتیک، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۸/۱۲/۱۹ تاریخ پذیرش:۱۳۹۹/۰۴/۱۰

## چکیده

**زمینه و هدف:** افزایش مصرف غذا در خارج از منزل در جوامع مختلف خطر انتقال میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا منتقله از غذا را به عنوان یک مشکل بهداشت جهانی مطرح کرده است. روش‌های تایپینگ ملکولی نظیر Rep-PCR الگوهای DNA برای تمایز و شناسایی سویه‌های بیماری‌زا را فراهم می‌نمایند. هدف از این مطالعه بررسی دقت روش انگشت‌نگاری ملکولی مبتنی بر توالی‌های تکرار شونده (Rep-PCR)، در تعیین قرابت بین ایزوله‌های مختلف *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده از گوشت گوساله به عنوان عامل عفونت‌های ناشی از غذا بود.

**روش بررسی:** این یک مطالعه توصیفی تحلیلی است که به صورت مقطعی در سال ۱۳۹۷انجام شد. ۸۰ نمونه گوشت با روش‌های بیوشمیایی و ملکولی از نظر وجود *انتروکوکوس فاسیوم* مورد بررسی قرار گرفتند و الگوی ملکولی قطعات DNA براساس حضور یا غیاب باندها و اندازه آنها در ژل الکتروفورزیس مشخص شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های ضریب همبستگی کوفنتیک تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** از میان ۸۰ نمونه گوشت گوساله مورد مطالعه، ۶۶ نمونه(۸۲/۵ درصد) آلوده به *انتروکوک* شناسایی شد که تعداد۳۰ نمونه(۴۵/۴۵ درصد) آلوده به *انتروکوکوس فاسیوم* بود. بر اساس دسته‌بندی ژنتیکی به روش Rep-PCR، ۳۰ ایزوله *انتروکوکوس فاسیوم* در ۱۸ پروفایل قرار گرفتند. قرار گرفتن ایزوله‌ها مورد مطالعه در چند زیر گروه نشانگر قدرت تمایز قابل قبول تکنیک Rep-PCR در ژنوتایپینگ *انتروکوکوس فاسیوم* می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج تحقیق حاضر نشان داد که روش Rep-PCR، روشی ساده، سریع و با قدرت تفرق بالایی جهت توصیف تنوع ژنتیکی سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** *انتروکوکوس فاسیوم*، ژنوتایپینگ، گوشت قرمز، Rep-PCR

[*]**نویسنده مسئول: خلیل خاشعی ورنامخواستی**، کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، گروه ژنتیک
**Email:** Khalil.khashei2016@gmail.com

**مقدمه**

امروزه با وجود پیشرفت تکنولوژی علوم و صنایع غذایی، بیماری‌های ناشی از غذا به عنوان مهم‌ترین مسئله در سراسر جهان، باقی مانده است. هم‌چنین در دنیای امروز صدها میلیون انسان به بیماری‌های قابل انتقال از طریق غذا و آب مبتلا هستند و این مسئله در کشورهای در حال توسعه و در میان افراد با ضعف سیستم ایمنی در حال افزایش است. در چند دهه گذشته، گزارش‌های فراوانی مبنی بر افزایش بیماری‌های منتقله از غذاهای آلوده وجود داشته است. آنتروکوک‌ها از انواع باکتری‌های منتقله از مواد غذایی می‌باشند(۱). باکتری‌های جنس آنتروکوکوس، کوکسی‌های گرم مثبت، بدون اندوسپور و کپسول مشخص هستند که در رنگ‌آمیزی گرم به شکل گِرد یا بیضی با آرایش دوتایی یا زنجیر کوتاه مشاهده می‌شوند و از اجزای مشترک جامعه فلور پستانداران، پرندگان، حشرات و خزندگان هستند و معمولاً در خاک، گیاهان و آب یافت می‌شوند. این ارگانیسم‌ها، به دلیل توانایی خود برای انطباق با تنش‌های محیطی حایز اهمیت می‌باشند. در انسان، انتروکوکوس فاسیوم می‌تواند باعث ایجاد عفونت‌های دستگاه ادراری، عفونت زخم، باکتریمی و اندوکاردیت عفونی شوند(۴-۲). انتروکوکوس فاسیوم باکتری گرم مثبت و بی‌هوازی می‌باشد و در دستگاه گوارش پستانداران، مدفوع انسان، محصولات لبنی، سطح گیاهان و حشرات یافت می‌شود(۶ و۵). شناسایی و طبقه‌بندی صحیح و دقیق باکتری‌ها، به خصوص در بررسی‌های اپیدمیولوژیک در محیط‌های بیمارستان، بسیار حایز اهمیت است و به طراحی روش‌هایی جهت کنترل پاتوژن کمک فراوان می‌کند. در گذشته از ویژگی‌های فنوتیپی مانند؛ بیوتیپ، سروتیپ، باکتریوفاژ یا باکتریوسین تیپ و پروفایل حساسیت به آنتی‌بیوتیک جهت تایپینگ میکروب‌ها استفاده می‌شد، ولی امروزه پیشرفت روش‌های مولکولی در دو دهه اخیر، آن‌ها را برای تایپینگ مولکولی بسیار کارآمد کرده است. به طور کلی روش‌های مبتنی بر DNA مانند PCR به عنوان تکنیک قابل اطمینان، ساده و ارزان برای شناسایی و طبقه‌بندی باکتری‌ها می‌باشند. تکنیک‌های مولکولی مبتنی بر PCR از قبیل توالی ژن *16srRNA*(۸ و۷) هیبریدیزاسیون DNA-DNA، بایوتایپینگ، RAPD-PCR، AFLP، PFGE و Rep-PCR به عنوان روش‌هایی با ضریب اطمینان بالاتر نسبت به روش‌های ابهام آمیز و وقت گیر رایج فنوتیپی و بیوشیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرند(۱۳-۹). تکثیر نواحی تکراری ژنوم باکتریایی با روش Rep -PCR به عنوان یک روش قابل اعتماد جهت تاکسونومی، ژنوتایپینگ مولکولی و تعیین روابط فیلوژنی گونه‌های بسیار نزدیک به یکدیگر و حتی در تمایز سوش‌های باکتریایی یک‌گونه مطرح می‌باشد. برای مثال، این تکنیک به عنوان یک روش ارزشمند جهت شناسایی و تایپینگ باکتری‌های مختلفی از جمله لاکتوباسیل‌ها و انتروکوک‌ها به‌کار رفته است. اثبات ارتباطات کلون‌های یک پاتوژن به ما این امکان را می‌دهد که منبع آلودگی(انسان یا محیط) را پیدا کرده، سویه‌های عفونی از سویه‌های غیر عفونی را

متمـایز نمـوده و در نهایـت عـود را از عفونـت مجـدد تفکیک نماییم(۱۷ـ۱۴).در مطالعه حاضر نیـز، هـدف بررسی دقت روش ملکولی مبتنـی بـر تـوالی‌هـای تکـرار شـونده(Rep-PCR) در تعیـین قرابـت بـین ایزوله‌های مختلف *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده از گوشت گوساله عرضه شده بـه بـازار مصـرف شهرستان شهرکرد بود.

**روش بررسی**

این یک مطالعه توصیفی ـ تحلیلی است که بـه صورت مقطعی در سـال ۱۳۹۷ انجـام شـد. ۸۰ نمونـه گوشت گوساله از مراکز عرضه گوشت در شهرستان شهرکرد تهیه شد و در شرایط استریل و در مجاورت یخ بـه مرکـز تحقیقـات میکروبیولـوژی دانشـگاه آزاد سلامی واحد شهرکرد منتقل شد. سپس ۵ گـرم از هـر نمونه گوشت توزین شد و با ۱۰ میلی‌لیتر فسفات بافر سالین مخلوط و یکنواخت شد. در ادامـه ۳۰۰ میکـرو-لیتـر از محلـول مـورد نظـر در یـک محـیط حـاوی کانامایسین اسکولین آگـار پخـش شـد و بـه مـدت ۲۴ ساعت در دمـای ۳۷ درجـه سـانتی‌گـراد انکوبـه شـد. کلنی‌های رشد یافته در هر پلیت پـس از سـپری شـدن مـدت انکوباسـیون از نظـر رنـگ‌آمیـزی گـرم، تسـت کاتالاز، اکسیداز، رشد در حضور ۶/۵ درصـد نمـک و تخمیر قندهای آرابینوز، مانیتول، سوربیتول، لاکتوز و سوربوز(۱۸) تعیین هویت شدند(شکل ۱).

بـــه منظـــور تشـــخیص مولکـــولی وجـــود *انتروکوکوس فاسیوم* در نمونه‌های کشت داده شده از واکـنش زنجیـره‌ای پلیمـراز اسـتفاده شـد. ابتـدا DNA ژنومی باکتری‌هـا بـا اسـتفاده از کیـت اسـتخراج DNA (شرکت سیناژن، ایران) مطـابق بـا دسـتورالعمل کیـت استخراج شد. شایان ذکر است که به منظـور ارزیـابی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های مـورد مطالعـه از روش الکتروفـورز روی ژل آگـارز اسـتفاده شـد. برای این منظور ۵ میکرولیتـر از DNA اسـتخراج شـده روی ژل یک درصد آگارز الکتروفـورز گردیـد. بـرای کمیـت سـنجی DNA اسـتخراج شـده از دسـتگاه بایوفوتومتر استفاده شد و با اندازه‌گیری میـزان DNA نمونه در طول موج نـوری ۲۸۰ نـانومتر، میـزان DNA موجود در نمونه تعیین شد. باید خاطر نشان کـرد کـه نمونـه‌هـایی بـا کیفیـت مناسـب و کمیتـی معـادل ۵۰ نـانوگرم بـرای مراحـل بعـدی و انجـام واکـنش PCR انتخاب شـدند(۱۹). جهـت تأییـد قطعـی *انتروکوکـوس فاسـیوم* در ایزولـه‌هـا، ردیـابی ژن کـد کننـده RNA ریبوزومی ۱۶ سوودبرگ، واکنش PCR بـا اسـتفاده از زوج پرایمرهای ذکر شده در جدول ۱ صورت گرفت. مخلوط واکنش با حجم نهایی ۲۵/۴۵ میکرولیتر شامل؛ ۲/۵ میکرولیتر بافر(۱۰x)، ۱۸/۵ میکرولیترddH2O، ۰/۵ میکرولیتـــر دئوکســـی نوکلئوتیـــد تـــری فسفات(۰/۲میلی‌مول)(سیناژن، ایران)، ۰/۷۵ میکرولیتر منیزیم کلرید(۱/۵ میلی‌مول)، ۱ میکرولیتر از هر یک از زوج پرایمرهای پیشرو و پسرو، ۰/۲ میکرولیتر آنـزیم تگ پلیمراز (سیناژن، ایران) و ۱ میکرولیتر از DNA(۵۰ نـانوگرم) هـر نمونـه آمـاده گردیـد و تحـت برنامـه دمـــایی-زمـــانی مشـــخص(جدول ۱) در دســـتگاه

ترموسایکلر مستر سایکلر گرادیانت (اپندروف، آلمان) قرار گرفت. در ادامه محصول PCR روی ژل ۱/۵ درصد آگارز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۱۲۰ ولت در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمنتاز، آلمان) الکتروفورز شد و نتیجه حاصله به وسیله دستگاه تصویربردار از ژل(انگلستان، Uviteck) بررسی شد.

برای انجام واکنش Rep-PCR از پرایمر REP1R با توالی '5'-IIIICGICGICATCIGGC-3 و پرایمر REP2I با توالی '5'-IIICGNCGNCATCNGGC-3 استفاده شد(۲۰). انجام واکنش Rep-PC با استفاده از میکروتیوپ حاوی پرمیکس(حاوی مسترمیکس لیوفیلیزه) (AccuPower PCR PreMix, Bioneer Corporation, Korea) در حجم ۲۵ میکرولیتر و با افزودن آب دیونیزه و نمونه DNA استخراج شده و پرایمرها در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. برای انجام واکنش Rep-PCR برنامه زمانی ـ دمایی شامل؛ یک سیکل در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه، ۳۰ سیکل در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، در ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه و در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و سپس یک سیکل در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به دستگاه ترموسایکلر داده شد. الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۲ درصد در شرایط بافری(بافر TBE 1x) در ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. سپس از طریق رنگ‌آمیزی ژل با محلول رنگی Safe Stain (سیناژن، ایران)، نتیجه به وسیله دستگاه تصویربردار از ژل(انگلستان، Uviteck) بررسی شد. انگشت‌نگاری Rep-PCR با سه بار تکرار برای هر یک از ایزوله‌های مورد مطالعه صورت گرفت تا از تعداد باندهای ایجاد شده اطمینان حاصل شود.

از نرم‌افزار NTSYS version2.02e جهت ترسیم دندروگرام و آنالیز تصاویر حاصل از الکتروفورز نمونه‌های مورد مطالعه،استفاده شد. برای این منظور ابتدا باندهای حاصل از الکتروفورز، به صورت داده‌های کمی صفر و یک(وجود باند یا عدم وجود باند) امتیازدهی شدند. سپس شباهت ژنتیکی بر اساس داده‌های صفر و یک با استفاده از ضریب جاکارد و دایس و تطابق ساده محاسبه شد. به منظور تعیین کارایی روش Rep-PCR تجزیه خوشه‌ای بر مبنای ضرایب تشابه، از ضریب همبستگی کوفنتیک استفاده شد. سپس برای گروه‌بندی سویه‌ها، تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA ( Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages) بر مبنای ضریب تشابهی که بالاترین ضریب همبستگی کوفنتیک را دارا بود، استفاده شد.

**شکل ۱: واکنش *انتروکوکوس فاسیوم* در محیط کشت کانامایسین اسکولین آگار**(تغییر رنگ محیط به منزله رشد باکتری است)

**جدول۱. توالی پرایمرها و برنامه دمایی- زمانی واکنش PCR مربوط به ردیابی ژن 16srRNA در ایزوله‌های *انتروکوکوس فاسیوم***

| ژن | توالی پرایمر | اندازه محصول | برنامه‌ی دمایی ـ زمانی **PCR** |
|---|---|---|---|
| 16srRNA | F: TCAACCGGGGAGGGT<br>R: ATTACTAGCGATTCCGG | ۷۳۳bp | ۱ سیکل<br>(درجه سانتی‌گراد) ۹۵- ۶(دقیقه)<br>۳۰ سیکل تکراری<br>(درجه سانتی‌گراد)۹۴ – ۳۰ (ثانیه)<br>(درجه سانتی‌گراد)۵۴ – ۳۵ (ثانیه)<br>(درجه سانتی‌گراد)۷۲ – ۴ (دقیقه)<br>۱ سیکل<br>(درجه سانتی‌گراد در)۷۲ – ۵ (دقیقه) |

**یافته‌ها**

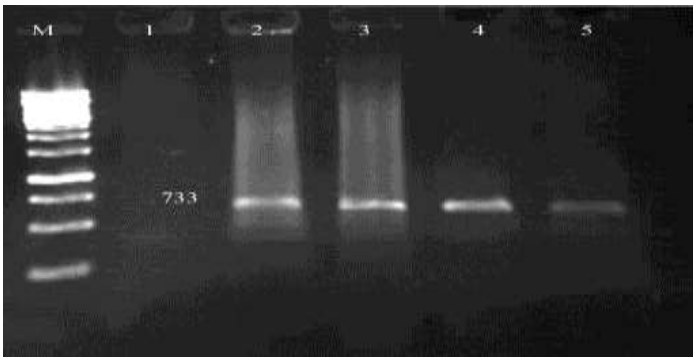
در پژوهش حاضر از مجموع ۸۰ نمونه مورد مطالعه، ۶۶ نمونه(۸۲/۵ درصد) آلوده به انتروکوک شناسایی شد که تعداد ۳۰ نمونه(۴۵/۴۵ درصد) آلوده به *انتروکوکوس فاسیوم* بودند. علاوه بر آزمون‌های میکروبی متداول به منظور تشخیص ایزوله‌های *انتروکوکوس فاسیوم* از روش PCR جهت ردیابی ژن 16srRNA استفاده شد، نتیجه حاصل از ردیابی ژن 16srRNA در شکل ۲ که حاصل از الکتروفورز محصول این ژن می‌باشد، نشان داده شده است. حضور قطعه‌ی ۷۳۳ جفت بازی تأیید کننده این مطلب است.

در این بررسی جهت دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌ها از روش Rep-PCR استفاده شد که در این راستا ۳۰ ایزوله مورد مطالعه سه نوبت با روش Rep-PCR آزمایش و پس از اطمینان از حضور قطعات تکثیر یافته آنالیز انجام شد(تصویر ۴ و ۳).

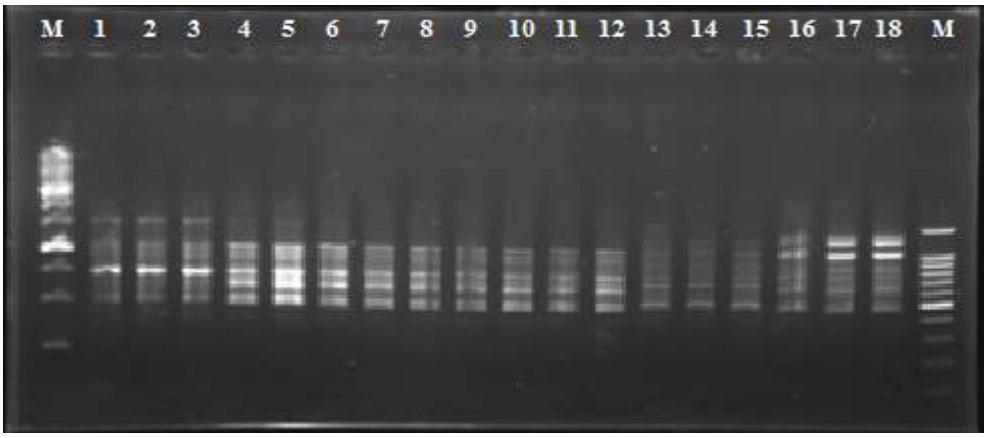
طبق تصاویر(۴ و ۳) ایزوله‌های مورد مطالعه دارای باندی از محدوده ۴۰۰ تا ۱۲۵۰ جفت بازی DNA بودند که قطعات تکثیر یافته در ایزوله‌ها در قالب اعداد

۱(وجود باند) و(عدم وجود باند) امتیازدهی و به وسیله بازخوانی مقادیر کامپیوتری ژل‌ها در برنامه NTSYS آنالیز شدند. پس از امتیازدهی ژل‌ها، شباهت ژنتیکی بر اساس داده‌های ۰ و ۱ با استفاده از ضرایب جاکارد، دایس و تطابق ساده محاسبه شد که ضریب کوفنتیک محاسبه شده برای الگوریتم UPGMA و هر کدام از سه ضریب فوق در جدول ۲ آورده شد است.

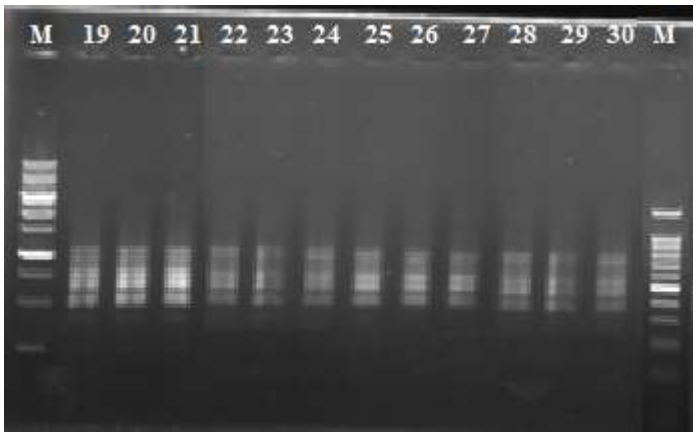
طبق اطلاعات جدول ضریب تشابه جاکارد(۰/۸۵۰۹) بزرگتر از دو ضریب دایس و تطابق ساده بود، لذا جهت محاسبه درصد تشابه ژنتیکی ایزوله‌ها و ترسیم نمودار دندروگرام (شکل ۵) از این ضریب استفاده شد. در نشانگر Rep-PCR قرابت ژنتیکی ۱۰۰ درصد بین ایزوله‌های ۱۹، ۲۱، ۲۲ و ۲۳، همچنین بین ایزوله‌های ۲۵ و ۲۶ و ایزوله‌های ۲۷ و ۲۸ مشاهده شد. بین ایزوله‌های ۲ و ۷ قرابت ۹۰ درصد، بین ایزوله‌های ۲ و ۱۲ و ایزوله‌های ۱۰ و ۱۲ قرابت ۸۰ درصد، بین ایزوله‌های ۱۴ و ۲۴ قرابت ۷۷ درصد، بین ایزوله‌های ۲ و ۱۲ وایزوله‌های ۲و ۱۳ و ایزوله‌های ۲ و۱۴ قرابت ۷۲ درصدی گزارش شد. قرابت ۵۰ درصدی نیز بین تعداد زیادی از ایزوله‌ها مشاهده شد.




**شکل ۲: ژل حاصل از الکتروفورز محصول** PCR **مربوط به ردیابی ژن** 16srRNA **در ایزوله‌های *انتروکوکوس فاسیوم*** . **ستون** M : **مارکر ۱کیلو جفت بازی** DNA **فرمنتاز**. ستون ۱: نمونه کنترل منفی، ستون های ۵-۲ : نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۷۳۳ جفت بازی DNA مربوط به ژن 16srRNA



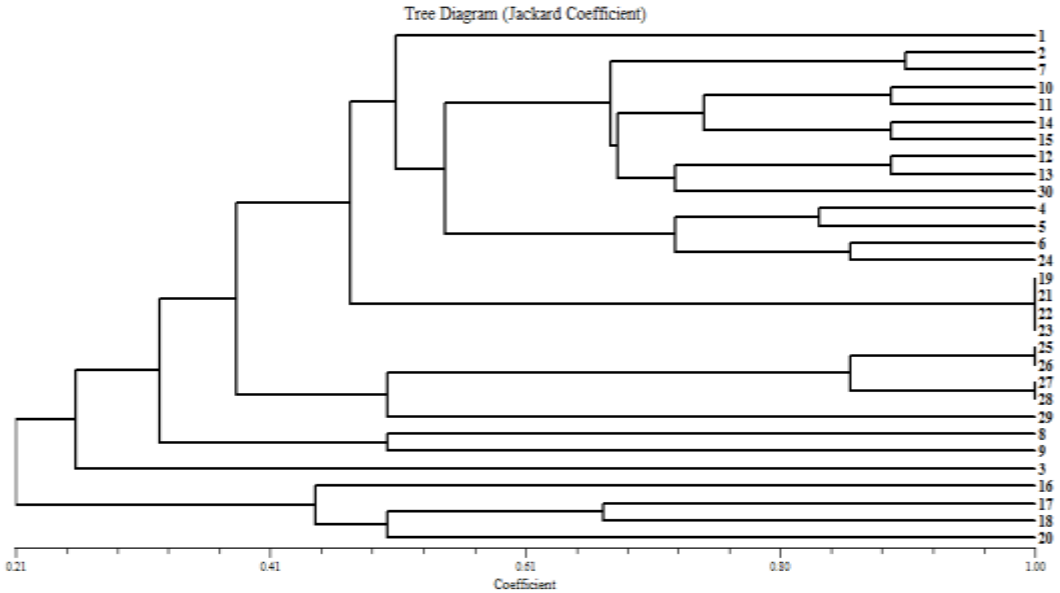

**شکل ۳: ژل حاصل از الکتروفورز محصول** Rep-PCR **روی ایزوله‌های *انتروکوکوس فاسیوم*** **(ایزوله‌های ۱- ۱۸)(ستون** M : مارکر ۱ کیلو بازی DNA )




**شکل ۴: ژل حاصل از الکتروفورز محصول** Rep-PCR **روی ایزوله‌های *انتروکوکوس فاسیوم* (ایزوله‌های ۱۹– ۳۰)**(ستون **M** : مارکر ۱ کیلو بازی **DNA** )

**جدول ۲: ضریب کوفنتیک محاسبه شده برای الگوریتم UPGMA و ضرایب تشابه جاکارد، دایس و تطابق ساده روی ایزوله‌های *انتروکوکوس فاسیوم* با نشانگرREP-PCR**

| ضریب تشابه الگوریتم | ضریب تشابه جاکارد(J) | ضریب تشابه دایس(DICE) | ضریب تشابه تطابق ساده الگوریتم(SM) |
|---|---|---|---|
| جفت گروه بدون وزن با میانگین حسابی (UPGMA) | ۰/۸۵۰۹ | ۰/۷۰۶۰۷ | ۰/۷۱۰۲۴ |




**شکل ۵: دندروگرام حاصل از آنالیز ایزوله‌های *انتروکوکوس فاسیوم* با نشانگرREP-PCR بر مبنای ضریب جاکارد**

## بحث

روش Rep -PCR به عنوان یک روش قابل اعتماد جهت تاکسونومی، ژنوتایپنگ مولکولی و تعیین روابط فیلوژنی گونه‌های بسیار نزدیک به یکدیگر و حتی در تمایز سوش‌های باکتریایی یک‌گونه مطرح می‌باشد.هدف از این مطالعه تعیین و بررسی روش انگشت نگاری مولکولی مبتنی بر توالی‌های تکرار شونده(Rep-PCR) در ژنوتایپینگ ایزوله‌های *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده از گوشت قرمز به عنوان عامل عفونت‌های ناشی از غذا بود.

حفاظت از منابع غذایی شامل؛ ملاحظات میکروبی و ایمنی کالاهای مورد مصرف عموم است. این نگرانی‌ها اغلب خاص میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌باشد که سریعاً بهداشت عمومی را به خطر می‌اندازند. *انتروکوک‌ها* گروه مهم و متنوعی از باکتری‌ها هستند که ارتباط پیچیده‌ای با انسان دارند. برخی از گونه‌ها در صنایع غذایی کاربرد داشته در حالی که تعدادی از آن‌ها باعث ایجاد بیماری‌های مختلف در انسان و حیوانات می‌شوند. *انتروکوک‌ها* دومین عامل ایجاد کننده عفونت‌های ادراری و سومین عامل باکتریمی در جهان بوده و میکروارگانیسم‌هایی مشکل‌ساز از نظر درمان به حساب می‌آیند(۲۱). این میکروارگانیسم‌ها عمدتاً در روده یافت می‌شوند، حضور زیاد آن‌ها در مواد غذایی می‌تواند دلیلی بر آلودگی مدفوعی باشد. طی پژوهش‌های انجام شده، *انتروکوک‌ها* و کلی فرم‌ها به عنوان دو شاخص مهم بهداشتی مطرح هستند. *انتروکوک‌ها* 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، جداسازی و بررسی *انتروکوک‌ها* به عنوان یکی از شاخص‌های بهداشتی در سایر مواد غذایی غیر از لبنیات نیز گزارش شده است. در نتیجه بررسی ۲۰۰ نمونه مختلف مواد غذایی شامل؛ انواع گوشت گاو، ماهی و طیور، همبرگر، پیتزا، ناگت مرغ، استیک گاوی، سالاد و انواع ادویه‌ها طی یک سال در کشور ترکیه آلودگی ۵۰ درصدی به *انتروکوک‌ها* گزارش شد(۲۲).

به طور مشابه باربوسا و همکاران در شمال پرتقال نیز جداسازی ۱۸۲ ایزوله *انتروکوک* از فرآورده‌های گوشتی تخمیری سنتی را گزارش کردند که بیشترین ایزوله‌ها به ترتیب مربوط به *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* بودند. در این مقالات، به عدم رعایت صحیح اصول بهداشتی در مراحل مختلف تولید تا عرضه از جمله آلودگی تجهیزات، ظروف و پایین بودن بهداشت فردی پرسنل مرتبط اشاره شده است. محققین دیگر نیز جداسازی انواعی از *انتروکوک‌ها* را از مواد غذایی همچون فرآورده‌های تخمیری سویا، انواعی از فرآورده‌های تخمیری گیاهی محصولات آبزیان و فرآورده‌های دریایی گزارش نموده‌اند(۲۳). به کارگیری روش‌های مرسوم بیوشیمیایی مانند؛ تخمیر قندها، تولید گاز از جمله روش‌های مرسوم در شناسایی باکتری‌ها به شمار می‌رود و لیکن این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی می‌باشند که از جمله آن می‌توان به صرف وقت و

هزینه و نیز ابهام‌آمیز بودن نتایج آزمایشات اشاره کرد، بنابراین به کارگیری تکنیک‌های مولکولی مختلف سبب رفع مشکلات فوق‌الذکر گردیده است. از طرفی در فرآیند جداسازی همواره جمعیت انبوهی از باکتری‌ها جداسازی و خالص سازی می‌شوند که همواره تعدادی از این باکتری‌ها، سوش‌های یکسانی از باکتری‌های یک گونه می‌باشند. بنابراین انتخاب یک روش مولکولی دقیق و قابل اطمینان و به تبع آن، بهنیه سازی در وقت و هزینه از ضروریات امر می‌باشد. روش Rep-PCR به عنوان یک روش قابل اعتماد جهت تاکسونومی، ژنوتایپینگ مولکولی و تعیین روابط فیلوژنی گونه‌های بسیار نزدیک به یکدیگر و حتی در تمایز سوش‌های باکتریایی یک گونه مطرح می‌باشد. برای مثال، این تکنیک به عنوان یک روش ارزشمند جهت شناسایی و تایپینگ باکتری‌های مختلفی از جمله *لاکتوباسیل‌ها* و *انتروکوک‌ها* به کار رفته است. از مزایای این روش می‌توان به سهولت روش، سرعت کار و قابلیت اجرا در تمامی آزمایشگاه‌ها اشاره کرد. Rep-PCR با انواعی از نشانگرها قابل انجام است که در میان آن‌ها، نشانگر۵ (GTG) به طور موفقیت‌آمیزی جهت شناسایی و مشخص نمودن گونه‌های *لاکتوباسیل‌ها* و *بیفیدوباکتریوم‌ها* مورد استفاده قرار گرفته است. در سال‌های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۹ جهت شناسایی *لاکتوباسیل‌های* جدا شده از نمونه‌های انسانی(۲۴) و در سال‌های ۲۰۰۷ و ۲۰۰۸ جهت شناسایی *لاکتوباسیل‌های* جدا شده از منابع غذایی از تکنیک Rep-PCR استفاده شد(۲۶ و۲۵). در تحقیق حاضر نیز از روش Rep-PCR جهت دسته‌بندی ایزوله‌های *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده از گوشت گوساله عرضه شده به بازار مصرف شهرستان شهرکرد استفاده شد. بر اساس تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از روش Rep-PCR، ایزوله‌های مورد مطالعه در ۱۸ پروفایل مختلف، دسته بندی شدند و میزان قرابت ژنتیکی آنها با ضریب جاکارد تعیین شد. بین ایزوله-های ۱۹، ۲۱، ۲۲ و ۲۳، همچنین بین ایزوله‌های ۲۵ و ۲۶ و ایزوله‌های ۲۷ و ۲۸ قرابت ۱۰۰ درصد مشاهده شد که می‌تواند دلیلی بر مشترک بودن منشأ آلودگی نمونه گوشت باشد. بین ایزوله‌های ۲ و ۷ قرابت ۹۰ درصد، بین ایزوله‌های ۲ و ۱۲ و ایزوله‌های ۱۰ و ۱۲ قرابت ۸۰ درصد، بین ایزوله‌های ۱۴ و ۲۴ قرابت ۷۷ درصد، بین ایزوله‌های ۲ و ۱۲ وایزوله‌های ۲و ۱۳ و ایزوله‌های ۲و ۱۴ قرابت ۷۲ درصدی گزارش شد. قرابت ۵۰ درصدی نیز بین تعداد زیادی از ایزوله‌ها مشاهده شد. به طور مشابه در تحقیقی که به وسیله تفویضی و تاج آبادی ابراهیمی به روش انگشت نگاری DNA بر مبنای توالی‌های تکرار شونده ژنومی در گونه‌های *لاکتوباسیل* بومی ایران با استفاده از (GTG)5-Rep-PCR صورت گرفت، در ۲۰ ایزوله مورد بررسی الگوی باندینگ متفاوتی دیده شد. در دندروگرام حاصل سه کلاستر اصلی مشاهده شد. پروفایل ژنومی ایزوله‌ها بر روی ژل باندهای تکراری در محدوده ۲۵۰۰ــ۲۵۰ جفت باز نشان داد که در مجموع ۱۶ باند پلی‌مورف مشاهده گردید. در این تحقیق کل باندهای شمارش شده ایزوله‌ها ۱۴۸ عدد

محاسبه گردید. ۲ ایزوله با ۱۱ باند بیشترین تعداد باند تکثیر یافته و ۲ ایزوله با ۴ باند، کمترین باند تکثیر یافته را به خود اختصاص دادند(۲۷). در تحقیق انجام شده به وسیله مارتین و همکاران که بر روی ۵۹۶ ایزوله *انتروکوکوس* جدا شده از فراورده‌های تخمیری صورت گرفت، سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* (۳۱/۴ درصد)، *انتروکوکوس فاسیوم*(۳۰/۷ درصد)، *انتروکوکوس سانجینیکولا*(۱۴/۹ درصد)، *انتروکوکوس گیلووس*(۱۰ درصد)، *انتروکوکوس گالیناروم*(۱/۳ درصد)، *انتروکوکوس کالسی فلاووس* (۳/۴ درصد)، *انتروکوکوس دوریسی*(۹/۷ درصد)، *انتروکوکوس مالادوراتوس*(۷/۲ درصد)، *انتروکوکوس هرمانینوس*(۰/۲ درصد) و *انتروکوکوس دورانس* (۰/۲ درصد) شناسایی شد(۲۸).

به دلیل وجود محدودیت‌هایی در پژوهش حاضر روش Rep-PCR دستی استفاده شده است. اگرچه این روش برای آنالیز مولکولی کاربردی است،اما استفاده از روش‌های خودکار مبتنی بر توالی‌های تکرار شونده برای پژوهش‌های آینده پیشنهاد می‌شود.

## نتیجه‌گیری

انتخاب یک تکنیک موفق در ژنوتایپینگ به سطح مهارت کاربران، امکانات آزمایشگاه و هدف بررسی وابسته است. به دلیل سهولت انجام و هزینه پایین در این مطالعه از روش Rep-PCR جهت دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های *انتروکوکوس فاسیوم* استفاده شد که قرار گرفتن ایزوله‌های مورد مطالعه در چندین زیر گروه(۱۸ پروفایل مختلف)، نشانگر قدرت تمایزدهی قابل قبول این تکنیک در ژنوتایپینگ *انتروکوکوس فاسیوم* می‌باشد. در مجموع نتایج تحقیق حاضر نشان داد که روش Rep-PCR، روشی ساده، سریع و کم هزینه جهت توصیف تنوع ژنتیکی سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* می‌باشد، اما توصیه می‌گردد که پژوهش‌های بیشتری روی نمونه‌های اخذ شده از منابع مختلف انجام و روش Rep-PCR با روش‌های نوین مولکولار نظیر PFGE و MLST مقایسه گردد.

## تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی با کد اخلاق IR.IAU.KAU.REC.1398.051 دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد می‌باشد، که با حمایت مالی و معنوی این دانشگاه انجام شد. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی و کلیه عزیزانی که نهایت همکاری را در اجرای این پژوهش داشتند، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

## REFERENCES


1.*Oprea S. F, Zervos M. J. Enterococcus and its association with foodborne illness. In: Foodborne Diseases. Humana Press 2007; 157-174.*

2.Hayden MK. Insights into the epidemiology and control infection with vancomycin-resistantEnterococci. Clin Infect Disease 2000 2000; 31(4): 1058-65.

3.Teymournejad O, Mohabati Mobarez A, Hosseini Doust R. Epidemiologic evaluation of vancomycin resistant genes in enterococcus spp. Isolated from clinical samples. JFUMS 2011; 1(2): 1-6.

4.Ghalandarzadeh Daryaei Z, Javadpour S, Kargar M. Frequency of *vanA &vanB* genes in vancomycin-resistant enterococci isolated from clinical specimens at Shahid Mohammadi hospitals Bandar Abbass. JMW 2013; 6(1): 23-33.

5.Harwood JV, Brownell M, Perusek W, Whitlock EJ. Vancomycin-resistant enterococcus spp. isolated from wastewater and chicken feces in the united states. Appl Environ Microbiol 2001; 67(10): 4930-3.

6.Kuhn I, Iversen I, Finn M, Greko C, Burman LG, Blanch AR, et al. Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different european regions. Appl Environ Microbiol 2005; 71(9): 5383-90.

7.Franz MAP, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. *Enterococci* in foods a conundrum for food safety. Int J Food Microbiol 2003; 888(2-3): 105-22.

8.Mozii F, Raya RR, Vignolo GM. Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. Int J Food Microbiol 2010; 87 (2): 532-555.

9.Cousins DV, Skuce RA, Kaswala RR, Van Embden JDA. Towards a standardized approach to DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis*. Int J Tuberc Lung Dis 1998; 2(6): 471-8.

10.Strompfova V, Laukova A, Simonova M, Marcinakova M. Occurrence of the structural *enterocin A, P, B,* L50B genes in *Enterococci* of different origin. Vet Microbiol 2008; 132(3-4): 293–301.

11.Kapatra V, Emel G. Draft genome sequence of a new homofermentative, lactic acid producing *Enterococcus faecalis* isolate. MCB 2014; 2(2): 140-7.

12.Yousefi L, Ehsani M, Fazeli M, Mojgani N, Ezatpanah H. Characterization of enterocin-like substances produced by two strains of Enterococci isolated from ewe's and goat's milks. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology 2011; 6(1): 33-42.

13.De Vuyst L, Vandamme EJ. Bacteriocins of lactic acid bacteria. 1st ed. London: Blackie Academic and Professional;1994; 6(2): 91-143.

14.Pandey N, Malik R, Kaushik J, Singroha G, Gassericin A. Circular bacteriocin produced by lactic acid bacteria *Lactobacillus gasseri.* World J Microbiol Biotechnol 2013; 29(10): 1977-87.

15.Mirhosseini M. Identification of bacteriocin producing Enterococcus in dairy products by PCR. Iran J Bio 2012; 25(3): 351-7.

16.Ashayerizadeh AN, Dabiri KH, Ghorbani MR. Effect of dietary supplementation of probiotic and prebiotic on growth indices and serum biochemical parameters of broiler chickens. Cell and Animal Biology 2001; 5(8):152-6.

17.Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpaa J, Garsin DA, Hook M, Erlandsen SL, Murray BE. Endocarditis and biofilm associated pili of *Enterococcus faecalis*. J Clin Invest 2006; 116(4): 2799–807.

18.Bakhshi Z, Bakhshi M. Practical diagnostic bacteria. 1st ed. Tehran: Jafari Publications; 2009; 82-3.

19.Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989; 58-152.

20.Svec P, Vancanneyt M, Seman M, Snauwaert C, Lefebvre K, Sedlaˇcek I, et al. Evaluation of (GTG)5-PCR for identification of enterococcus spp. FEMS Microbiol Lett 2005; 247(5): 59–63.

21.Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. Emerg Infect Dis 1998; 4(2): 239-49.

22.Foulquie Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of *enterococci* in food and health. International Journal of Food Microbiol 2006; 2(106): 1-24.

23.Barbosa AL, Jackson CR, Barrett JB, Hofacre CL. Effect of growth promotant usage on *enterococci* species on a poultry farm. Avian Diseases 2005; 3(49): 361-5.

24.Svec P, Vancanneyt M, Seman M, Snauwaert C, Lefebvre K, Sedla cek I, et al. Evaluation of (GTG)5-PCR for identification of Enterococcus spp. FEMS Microbiol Lett 2005; 247: 59–63.

25.Scheirlinck I, Van der Meulen R, Van Schoor A, Vancanneyt M, De Vuyst L. Influence of geographical origin and flour type on diversity of lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs. Appl Environ Microbiol 2007; 73: 6262–9.
26.Van Hoorde K, Verstraete T, Vandamme P, Huys G. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. Food Microbiol 2008; 25: 929–35.
27.Tafvizi F, Tajabadi Ebrahimi M. DNA Fingerprinting Based on Repetitive Sequences of Iranian Indigenous Lactobacilli Species by(GTG) 5-REP-PCR. Journal of Fasa University of Medical Sciences 2012; 2(3): 218-26.
28.Martin B, Corominas L, Garriga M, Aymerich T. Identification and tracing of *enterococcus* spp. by RAPD-PCR in traditional fermented sausages and meat environment. Journal of Applied Microbiology 2009; 106(4): 66–77.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

# Accuracy of REP-PCR Method in Genotyping of *Enterococcus faecium* Isolated From Red Meat as a Cause of Foodborne Infections

**Radmehr MR[1], Khashei Varnamkhasti KH[2*], Tajbakhsh E[1]**

[1]Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran, [2]Department of Genetics, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

Received: 09 Marc 2020 Accepted: 30 June 2020

## Abstract:

**Background & aim:** Increasing food consumption outdoors in different societies has raised the risk of transmission of foodborne pathogens as a global health problem. Molecular typing methods such as REP-PCR produced DNA profiles for differentiation and characterization of pathogenic strains. The aim of the present study was to evaluate the accuracy of molecular fingerprinting method based on repeated sequences (rep-PCR) to determine the affinities between different of *Enterococcus faecium* isolated from beef meat as a cause of foodborne infections.

**Methods:** The present cross-sectional descriptive-analytical study was conducted in 2018 on 80 meat samples examined by biochemical and molecular methods for the presence of Enterococcus faecium. The molecular pattern of DNA fragments was determined based on the presence or absence of bands and their size in gel electrophoresis. The collected data were analyzed using NTSYS software version 2.02e and *Cofenet correlation* coefficient.

**Results:** Of the total 80 samples, 66 (82.5%) were identified as *Enterococcus*, while 30 (45.45%) were *Enterococcus faecium*. Based on Genetic Classification by Rep-PCR, 30 isolates of *Enterococcus faecium* were included in 18 profiles. Placement of the studied isolates in several subgroups showed the acceptable discrimination power of Rep-PCR technique in genotyping of *Enterococcus faecium*.

**Conclusion:** The results of the present study revealed that Rep-PCR is a simple, fast, and highly dispersive method to describe the genetic diversity of Enterococcus faecium strains.and method with high dispersal ability to characterize the genetic diversity of *Enterococcus faecium* strains.

**Keywords:** *Enterococcus faecium*, Genotyping**,** Red meat, Rep-PCR

[*]**Corresponding author: Khashei Varnamkhasti KH,** Department of Genetics, School of Medicine, University of Islamic Azad, Kazerun, Iran
**Email:** Khalil.khashei2016@gmail.com

**Please cite this article as follows:**
Radmehr MR, Khashei Varnamkhasti KH, Tajbakhsh E. Accuracy of REP-PCR Method in Genotyping of *Enterococcus faecium* Isolated From Red Meat as a Cause of Foodborne Infections. Armaghane-danesh 2021; 26(1): 104-116.