# مقایسه مقاومت آنتی بیوتیکی و فاکتورهای ویرولانس در جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از منابع دامی و انسانی در سال ۱۳۹۷

**محمود شهوه[۱]، الهه تاج بخش[۱*]، حسن ممتاز[۱]، رضا رنجبر[۱و۲]**

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

۲. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیۀ الله (عج) تهران.

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۲۲

## چکیده

*انتروکوک*‌ها گروه مهم و متنوعی از باکتری‌ها هستند که به‌عنوان باکتری مقاوم به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در درمان بیماری‌ها شناخته شده‌اند. در این مطالعه مقطعی- توصیفی ۱۰۴ نمونه گوشت قرمز و ۱۰۰۰ نمونه ادرار مشکوک به عفونت دستگاه ادراری در شهرستان کرمانشاه جهت بررسی *انتروکوکوس فکالیس* مورد بررسی قرار گرفتند. پس از تایید نمونه‌ها با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی به‌منظور بررسی توانایی تولید بیوفیلم از روش میکروتیتر پلیت و برای تعیین حساسیت آن‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، از روش کربی- بایر استفاده گردید. در نمونه‌های انسانی آلودگی به *انتروکوکوس فکالیس* ۵ درصد و در نمونه گوشت مورد بررسی ۴۰/۳۸ درصد گزارش گردید. در جدایه‌های جدا شده از گوشت قرمز بیشترین مقاومت نسبت به استرپتومایسین و کمترین مقاومت نسبت به ونکومایسین گزارش شد. در جدایه‌های انسانی بیشترین مقاومت نسبت به کوتریموکسازول و کمترین مقاومت نسبت به نیتروفورانتئین گزارش گردید. در جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از گوشت قرمز، ژن *ebp A* (۷۱/۴۳ درصد)، *ebp B* (۵۹/۵۲ درصد) و *ebp C* (۶۴/۲۸ درصد) گزارش گردید که ارتباط آماری معنادار بین ژن‌های *ebp* وتولید بیوفیلم در این جدایه‌ها مشاهده نگردید. در صورتی‌که در جدایه-های جدا شده از ادرار بین ژن‌های *ebp* و تولید بیوفیلم ارتباط معنی‌دار مشاهده شد. هم‌چنین در تجزیه و تحلیل آماری بین نوع گوشت و نوع ژن ویرولانس رابطه معنی دار آماری مشاهده نگردید. در صورتی‌که بین فراوانی ژن‌های *efa A*، *gel E*، *ace* و *esp* در جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از ادرار و تولید بیوفیلم ارتباط معنی‌دار مشاهده شد.

**کلید واژه ها:** *انتروکوکوس فکالیس*، بیوفیلم، فاکتورهای ویرولانس، مقاومت آنتی بیوتیکی، گوشت، ادرار.

## مقدمه

*انتروکوک‌ها* اجزای مشترک جامعه فلور از پستانداران، پرندگان، حشرات و خزندگان هستند و معمولا در خاک، گیاهان و آب یافت می‌شوند. این ارگانیسم‌ها به دلیل توانایی خود برای انطباق با تنش‌های محیطی حائز اهمیت می‌باشند، آن‌ها اغلب از منابع زیست محیطی مانند آب، خاک، گیاهان کال و محصولات حیوانی جدا می‌شوند. استحکام ذاتی که این باکتری‌ها دارند به آن‌ها اجازه می‌دهد که به راحتی در محیط زیست گسترش پیدا کنند (Raafat et al., 2016).

حضور *انتروکوک* در دستگاه گوارش حیوانات ممکن است به آلودگی گوشت در زمان کشتار منجر شود. مصرف بی‌رویه و بدون نظارت آنتی‌بیوتیک‌ها و هم-چنین استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در غذای دام و طیور (مانند آووپارسین، باسیتراسین، ویرجینیامایسین، تتراسیکلین و آمپی‌سیلین) به‌عنوان فاکتور افزاینده رشد، می‌تواند یکی از عوامل ظهور *انتروکوک*‌های مقاوم به ونکومایسین باشند، سهولت در تبادل ژن‌های مقاومت ویرولانس بین سویه‌های *انتروکوک* و توانایی بالای این ارگانیسم در انتقال بین افراد و بیماران و محیط، فراوانی قابلیت انتشار این سویه‌ها را در بین محیط‌های مختلف تأیید می‌کند. *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* اغلب گونه‌های جداشده از نمونه‌های بالینی و مواد غذایی هستند که توانایی برای زنده ماندن در شرایط نامطلوب زیست محیطی را دارا

می‌باشند. این ویژگی ممکن است به گسترش و تداوم *انتروکوک* در محیط‌زیست کمک کند (Giraffa, 2002; Billington et al., 2014)

مطالعات نشان داده است که *انتروکوکوس فکالیس*، بیوفیلم تشکیل می‌دهد. بیوفیلم میکروبی توده‌ای از باکتری‌ها است که در ابتدا با نیروی واندروالسی به‌طور ضعیفی به سطوح بی‌جان یا بافت زنده متصل می‌شوند و در مرحله بعدی با تولید پلی‌مرهای خارج سلولی و ایجاد ساختار ماتریکس آلژینات، موجب اتصال غیر قابل برگشت سلول‌ها بـه سـطـوح مـی‌شـود، به‌طوری‌که در محیط‌های بیمارستانی بیوفیلم میکروبی روی سطوح مختلف به‌عنوان یک مخزن انتقال عفونت مطرح می‌شود و آن‌ها را مسئول ایجاد ۶۵ درصد عفونت‌های بیمارستانی ذکر می‌کنند. امروزه عوامل پاتوژن منتقله از غذا اهمیت بیشتری یافته‌اند (Rahimi et al., 2008; Momeni et al., 2020). دما، غلظت داروهای ضد میکروبی، ترکیبات غذایی و هم‌چنین عوامل ژنتیکی از عوامل مهم در تولید و گسترش بیوفیلم میکروبی به‌شمار می‌روند (Kuhn et al., 2005; Rahimi et al., 2008). ژن پروتئین سطحی انتروکوکی توانایی کلونیزاسیون و ایجاد بیوفیلم باکتریایی در محیط آزمایشگاهی را افزایش می‌دهد و به‌نظر می‌رسد که با حضور بیوفیلم در بدن جاندار نیز مرتبط می‌باشد. پروتئین سطحی انتروکوک که توسط ژن *esp* کروموزومی رمزدهی می‌شود با افزایش بیماری‌زایی، کلونیزاسیون، پایداری در مجاری ادراری و تشکیل بیوفیلم همراه است (Ispirli et al., 2017).

از جمله ژن‌های موثر در تولید بیوفیلم در جدایه‌های *انتروکوکوس* می‌توانیم به پیلی مرتبط با اندوکاردیت و بیوفیلم (*ebp*) Pili اشاره کنیم. پروتئین Ebp یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های کد شده در پاتوژنیستیه *انتروکوکوس فکالیس* می‌باشد. در اوپرون *ebp* پروتئین Ebp A که در نوک پیلی قرار دارد، نقش اصلی روند پاتوژنیسیته را ایفا می‌کند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که پروتئین Ebp به‌عنوان یک ادهزین در اتصال باکتری به پروتئین‌های فیبرینوژن و کلاژن نقش ایفا می‌کند که فرایندی بسیار مهم در مراحل اولیه عفونت می‌باشد. علاوه بر این مشخص گردیده که پروتئین Ebp برای تشکیل بیوفیلم از اهمیت بسیار زیادی برخوردار می‌باشد، به‌طوری‌که در مدل‌های تجربی، اندوکاردیت و عفونت دستگاه ادراری را سبب می‌شود (Nallapareddy et al., 2006; Nielsen et al., 2013; Medeiros et al., 2014).

*انتروکوکوس فکالیس* کوکسی گرم مثبت، کاتالاز منفی و بی‌حرکت می‌باشد. این باکتری قندهای سوربیتول، مانیتول و لاکتوز را تخمیر می‌کند، اما قادر به تخمیر قندهای آرابینوز و سوربوز نمی‌باشد. هم چنین قادر به هیدرولیز محیط بایل اسکولین آگار نیز می‌باشد.

## روش کار

در این مطالعه مقطعی- توصیفی که در سال ۱۳۹۷ انجام شد، ۱۰۴ نمونه گوشت قرمز شامل گوشت گوسفند، گاو، بز و گوساله و ۱۰۰۰ نمونه ادرار مشکوک به عفونت دستگاه ادراری جهت بررسی *انتروکوکوس فکالیس* مورد بررسی قرار گرفتند. ۰- با استفاده از فرمول برآورد حجم نمونه برای متغیر وابسته کمی تعداد ۱۰۰۰ نمونه ادرار مشکوک به عفونت دستگاه ادراری از نظر آلودگی به *انتروکوکوس فکالیس* مورد بررسی قرار گرفتند.

$$N = \frac{Z^2 \times \sigma^2}{D^2}$$

D: اشتباه مجاز (معمولا ۰/۰۵)

Z: مقدار متغیر نرمال

$\sigma$: واریانس متغیر مورد مطالعه

۵ تا ۱۰ سی سی نمونه ادرار مراجعه کننده گان به آزمایشگاه از طریق تکنیک ادرار وسط جهت جداسازی باکتری از نمونه‌های مورد بررسی از محیط کشت اختصاصی کانامایسین اسکولین-آزیدآگار ساخت شرکت مرک آلمان استفاده گردید. ۵ گرم از هر

نمونه گوشت با ۱۰ میلی لیتر فسفات بافر سالین مخلوط و یکنواخت گردید و مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از محلول مورد نظر در یک پلیت حاوی محیط کانامایسین اسکولین آگار پخش گردید و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. نمونه‌های ادرار نیز در شرایط استریل بر روی محیط کانامایسین اسکولین آزید آگار کشت داده شدند. سپس با استفاده از روش رنگ آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی کاتالاز، هیدرولیز هیپورات، تحمل نمک ۶/۵ درصد، رشد در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، احیای تلوریت، هیدرولیز اسید آمینه آرژینین و تخمیر قندهای آرابینوز، مانیتول، سوربیتول، لاکتوز و سوربوز، سویه‌های جدا شده تعیین هویت شدند (Manero and Blanch, 1999; Pereira et al., 2017).

برای بررسی قدرت اتصال جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* از روش میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده گردید. یک لوپ پُر از کلنی باکتری را به یک لوله حاوی محیط کشت ترپتیکاز سوی براث حاوی یک درصد گلوکز تلقیح نموده لوله‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس کشت یک شبه باکتری را به نسبت ۱/۱۰ رقیق نمودیم و ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی باکتری به داخل چاهک‌های میکروتیتر پلیت اضافه شد. بعد از تلقیح، درب پلیت گذاشته شده و انکوباسیون به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. بعد از گذشت این مدت، محتوی داخل چاهک‌ها خالی شده و شستشوی چاهک‌ها سه مرتبه با فسفات بافر سالین انجام شد. برای شستشو، پلیت‌ها به شدت تکان داده شدند تا سلول‌های غیر متصل حذف شوند. سپس پلیت‌ها در دمای اتاق خشک شدند و به مدت یک ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا فیکس شوند. سپس هر چاهک با ۲۰۰ میکرولیتر از کریستال ویوله ۰/۲درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه رنگ گردید آن‌گاه چاهک‌ها با فسفات بافر سالین به آرامی شسته شده و ۲۰۰ میکرولیتر اتیل الکل و استن را به پلیت‌ها اضافه کرده و بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب نوری چاهک‌های رنگ شده با کریستال ویوله در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شدند. به طوری‌که جدایه‌هایی که جذب نوری[1] مساوی یا بالاتر از ۰/۲۴ داشتند به‌عنوان بیوفیلم قوی، در صورتی‌که OD بین ۰/۱۲ تا ۰/۲۴ داشتند به عنوان بیوفیلم ضعیف و درصورتی‌که OD کمتر از ۰/۱۲ داشتند بیوفیلم منفی نظر گرفته شدند (Gapeleh et al., 2015). نمونه‌هایی که از نظر تشکیل بیوفیلم مثبت و منفی تشخیص داده می‌شوند، جهت بررسی‌های مولکولی با استفاده از کیت استخراج DNA، DNA آن‌ها استخراج گردید. برای تعیین حساسیت جدایه های *انتروکوکوس فکالیس* نسبت به آنتی بیوتیک‌ها از روش کربی- بایر بر طبق دستورالعمل CLSI[2] استفاده شد. جهت تعیین حساسیت باکتری‌های جدا شده از گوشت قرمز از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل: سیپروفلوکساسین (CP5)، تتراسیکلین (TE 30)، مروپنم (MEN 10)، کوتریموکسازول (SXT 25)، آمیکایسین (AN 30)، جنتامایسین (GM 10)، ونکومایسین (V 30)، کلرامفنیکل (C 30)، آموکسی‌سیلین (AM 10)، استرپتومایسین (S 10) و سفوتاکسیم (CTX 30) از شرکت پادتن طب ایران مورد استفاده قرار گرفتند. برای تعیین حساسیت باکتری‌های جدا شده از ادرار از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفتازیدیم (CAZ)، کوتریموکسازول (SXT 25)، آمیکایسین (AN 30)، جنتامایسین (GM 10)، نیتروفورانتیئن (FM)، نورفلوکساسین (NOR)، سفوتاکسیم (CTX 30) و ونکومایسین (V 30) (پادتن طب ایران) استفاده گردید.

[1] - Optical Density (OD)

[2] - Clinical and Laboratory Standards Institute

به‌منظور تشخیص مولکولی و تائید تشخیص باکتری‌های رشد کرده بر روی محیط کشت، استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (DNPTM) شرکت سیناژن انجام شد. جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد مطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز استفاده شد. به‌منظور کمیت سنجی DNA استخراج شده از دستگاه بایوفوتومتر استفاده شد و با اندازه‌گیری میزان DNA نمونه در طول موج نوری۲۸۰ نانومتر، میزان DNA موجود در نمونه تعیین گردید. نمونه‌های DNA که دارای کیفیت مناسب و کمیتی معادل ۵۰ نانوگرم بودند جهت مراحل بعدی و انجام آزمایش PCR انتخاب گردیدند (Sambrook and Russell., 2001). جهت تشخیص قطعی جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و ردیابی ژن‌های ویرولانس آزمایش PCR با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ انجام شد (Barbosa et al., 2010; Semedo et al., 2003; Medeiros et al., 2014). در این تحقیق از سویه استاندارد *Enterococcus faecalis* ATCC29212 تهیه شده از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های ویرولانس در جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس*

| Target gene | Primer Oligonucleotide sequences (5'-3') | Accission Number | Size of amplicon (bp) |
|---|---|---|---|
| *16srDNA* | RW015´-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3´<br>DJ745´-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3´ | CP015883.1 | 370 |
| *Ebp A* | F: CTAACAAAAATGATTCGGCTCCAG<br>R: ATCTCACGCATTTTATCTTCAACT | CP028285 | 517 |
| *Ebp B* | F: CTGAAGGAAAAACGGTCCAA<br>R: CTTTTGCGTCGTCAGTGTGT | CP022059 | 1003 |
| *Ebp C* | F: GATAAATATCAAGGACTGGCAGA<br>R: AAGCATACTCTCCAGAAGTCACG | CP022059 | 600 |
| *asa* | F: CCAGCCAACTATGGCGGAATC<br>R: CCTGTCGCAAGATCGACTGTA | CP22712 | 419 |
| *Gel E* | F: ACCCCGTATCATTGGTTT<br>R:: ACGCATTGCTTTTCCATC | KU311665 | 629 |
| *Cyl A* | F: TGGATGATAGTGATAGGAAGT<br>R: TCTACAGTAAATCTTTCGTCA | CP015883 | 517 |
| *Cyl M* | F: CTGATGGAAAGAAGATAGTAT<br>R: TGAGTTGGTCTGATTACATTT | AY032999 | 742 |
| *Afa A* | F: GACAGACCCTCACGAATA<br>R: AGTTCATCATGCTGTAGTA | KY070337 | 705 |
| *Cyl B* | F: ATTCCTACCTATGTTCTGTTA<br>R: AATAAACTCTTCTTTTCCAAC | KU311664 | 843 |
| *ace* | F: GAGCAAAAGTTCAATCGTTGAC<br>R:GTCTGTCTTTTCACTTGTTTCT | AF159247 | 1003 |
| *agg* | F: AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC<br>R: AAACGGCAAGACAAGTAAATA | CP002493 | 1553 |
| *esp* | F: TTGCTAATGCTAGTCCACGACC<br>R: GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA | AF034779 | 933 |

جدول ۲- برنامه PCR مورد استفاده برای ردیابی ژن‌های ویرولانس در جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس*

| Gene | PCR programme | M-PCR Volume (50 µL) |
|---|---|---|
| *Ebp A* | 1 cycle:<br>94 $^{0C}$ ---------- 5 min.<br>32 cycle:<br>94 $^{0C}$ ---------- 60 s | 5 µL PCR buffer 10X<br>2 mM Mgcl2<br>200 µM dNTP (Fermentas)<br>0.4 µM of each primers F & R |

| | | |
|---|---|---|
| | 60 $^{0C}$ ---------- 60 s<br>72 $^{0C}$ ---------- 2 min<br>1 cycle:<br>72 $^{0C}$ ---------- 5 min | 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas)<br>3 µL DNA template |
| *Ebp B* | 1 cycle:<br>94 $^{0C}$ ---------- 5 min.<br>32 cycle:<br>94 $^{0C}$ ---------- 60 s<br>55 $^{0C}$ ---------- 60 s<br>72 $^{0C}$ ---------- 2 min<br>1 cycle:<br>72 $^{0C}$ ---------- 10 min | 5 µL PCR buffer 10X<br>2 mM Mgcl2<br>200 µM dNTP (Fermentas)<br>0.4 µM of each primers F & R<br>1 U Taq DNA polymerase (Fermentas)<br>3 µL DNA template |
| *Ebp C* | 1 cycle:<br>94 $^{0C}$ ---------- 5 min.<br>32 cycle:<br>94 $^{0C}$ ---------- 60 s<br>58 $^{0C}$ ---------- 60 s<br>72 $^{0C}$ ---------- 2 min<br>1 cycle:<br>72 $^{0C}$ ---------- 10 min | 5 µL PCR buffer 10X<br>2 mM Mgcl2<br>200 µM dNTP (Fermentas)<br>0.4 µM of each primers F & R<br>1 U Taq DNA polymerase (Fermentas)<br>3 µL DNA template |
| *Asa, gel E* | 1 cycle:<br>95 $^{0C}$ ---------- 5 min.<br>30 cycle:<br>95 $^{0C}$ ---------- 30 s<br>51 $^{0C}$ ---------- 30 s<br>72 $^{0C}$ ---------- 60 s<br>1 cycle:<br>72 $^{0C}$ ---------- 6 min | 5 µl PCR buffer 10X<br>2.5 mm Mgcl2<br>200 µM dNTP (Fermentas)<br>0.5 µm of each primers F & R<br>2 U Taq DNA polymerase (Fermentas)<br>3 µl DNA template |
| *Cyl A, cyl M, afa A* | 1 cycle:<br>95 $^{0C}$ ---------- 6 min.<br>30 cycle:<br>94 $^{0C}$ ---------- 60 s<br>55 $^{0C}$ ---------- 60 s<br>72 $^{0C}$ ---------- 45 s<br>1 cycle:<br>72 $^{0C}$ ---------- 7 min | 5 µL PCR buffer 10X<br>2.5 mM Mgcl2<br>300 µM dNTP (Fermentas)<br>0.4 µM of each primers F & R<br>2 U Taq DNA polymerase (Fermentas)<br>3 µL DNA template |
| *Cyl B, ace, agg, esp* | 1 cycle:<br>94 $^{0C}$ ---------- 6 min.<br>35 cycle:<br>95 $^{0C}$ ---------- 60 s<br>54 $^{0C}$ ---------- 90 s<br>73 $^{0C}$ ---------- 45 s<br>1 cycle:<br>72 $^{0C}$ ---------- 7 min | 5 µL PCR buffer 10X<br>2.5 mM Mgcl2<br>300 µM dNTP (Fermentas)<br>0.4 µM of each primers F & R<br>2 U Taq DNA polymerase (Fermentas)<br>3 µL DNA template |

به منظور وجود قطعه تکثیر شده در آزمایش PCR از الکتروفورز محلول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد.

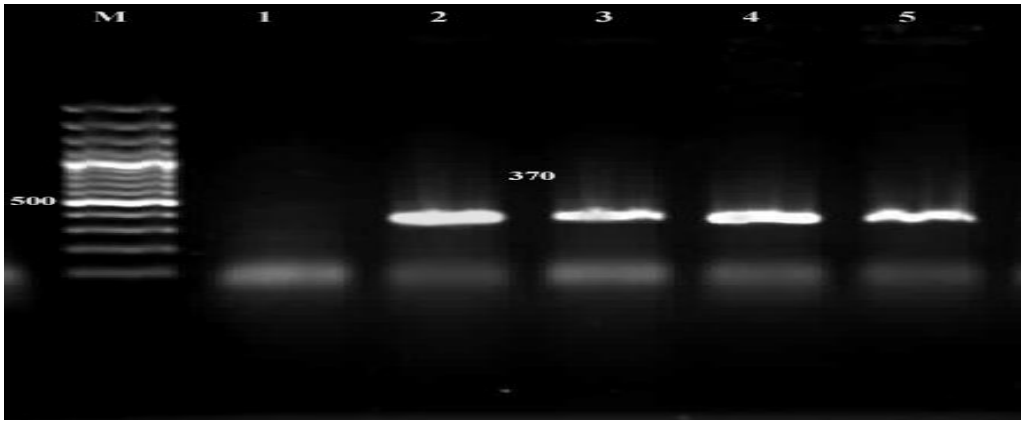
آنالیزآماری

آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ و آزمون دقیق فیشر و مربع کای انجام گردید.

**نتایج**

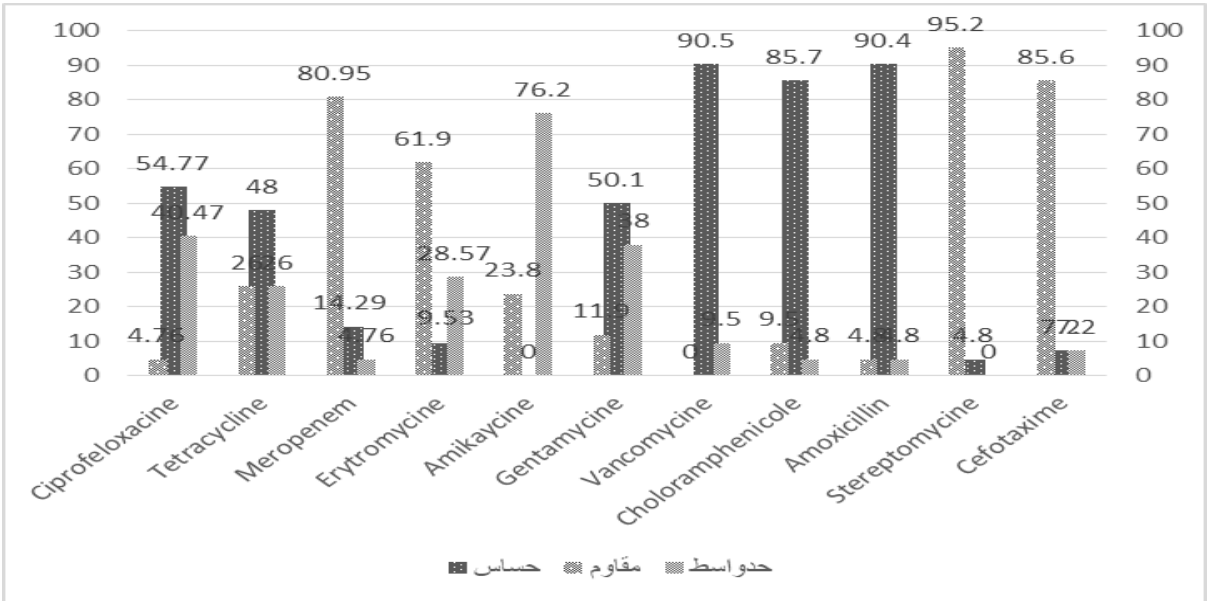
از ۱۰۰۰ نمونه ادرار مورد بررسی آلودگی به *انتروکوکوس فکالیس* در ۵۰ نمونه و از ۱۰۴ نمونه گوشت مورد بررسی تعداد ۴۲ نمونه (۴۰/۳۸ درصد) آلوده به باکتری *انتروکوکوس فکالیس* تشخیص داده شدند. آلودگی به گوشت گاو در ۶ نمونه (۱۴/۳ درصد)، آلودگی به گوشت گوساله در ۱۶ نمونه (۳۸/۱ درصد)، آلودگی به گوشت گوسفند و بز در ۱۰ نمونه (۲۳/۸ درصد) برآورد گردید. نتایج در نمودار ۱ نشان داده شده است. در بررسی مولکولی تمامی نمونه‌ها با داشتن باند

۳۷۰ جفت بازی در حضور پرایمر اختصاصی *16srDNA* مثبت تشخیص داده شدند. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون مربع کای، بین دو نوع گوشت و آلودگی به *انتروکوکوس فکالیس* رابطه معنی داری مشاهده گردید ($p$ <۰/۰۵).



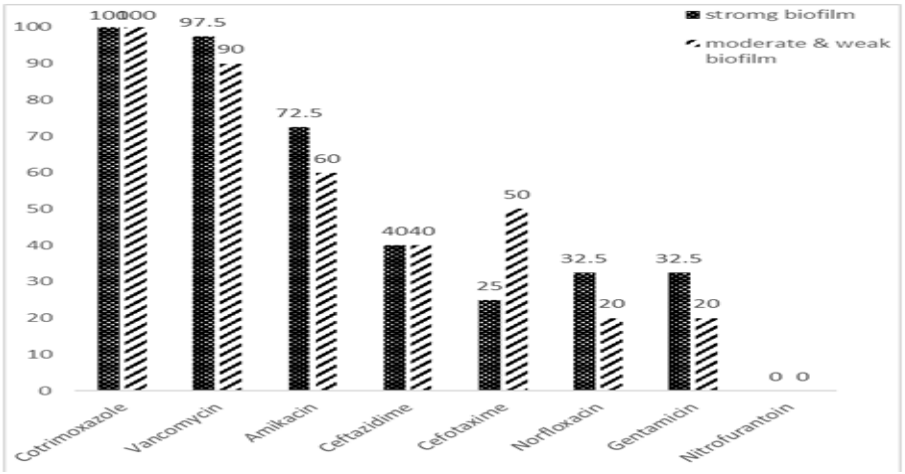

شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR ژن *16srRNA انتروکوکوس فکالیس*. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز. ستون ۱: کنترل منفی. ستون ۲ کنترل مثبت. ستون‌های ۳ و۴: نمونه‌های مثبت واجد باند ۳۷۰ جفت بازی.

در روش میکروتیتر پلیت از ۴۲ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از گوشت قرمز در ۳۳ جدایه واکنش بیوفیلم مشاهده شد که بر اساس OD در سه گروه قوی، متوسط و ضعیف طبقه بندی شدند. در ۲۹ جدایه (۶۹/۰۵ درصد) واکنش بیوفیلم قوی، در ۶ جدایه (۱۴/۲۸ درصد) واکنش بیوفیلم متوسط مشاهده شد و در ۷ جدایه (۱۶/۶۷ درصد) واکنش بیوفیلم مشاهده نگردید. در صورتی‌که جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از ادرار واکنش بیوفیلم قوی در ۴۰ جدایه (۸۰ درصد)، بیوفیلم متوسط در ۶ جدایه (۱۲ درصد) و واکنش بیوفیلم ضعیف در ۴ جدایه (۸ درصد) گزارش گردید. پس از تأیید باکتری با استفاده از آزمون‌های میکروبیولوژی و مولکولی، حساسیت باکتری‌های جدایه شده به آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده بررسی گردید. در جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از گوشت قرمز بیشترین مقاومت نسبت به استرپتومایسین (۹۵/۲ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به ونکومایسین (صفر درصد) گزارش شد. مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه-های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از گوشت قرمز در نمودار ۱ نشان داده شده است.



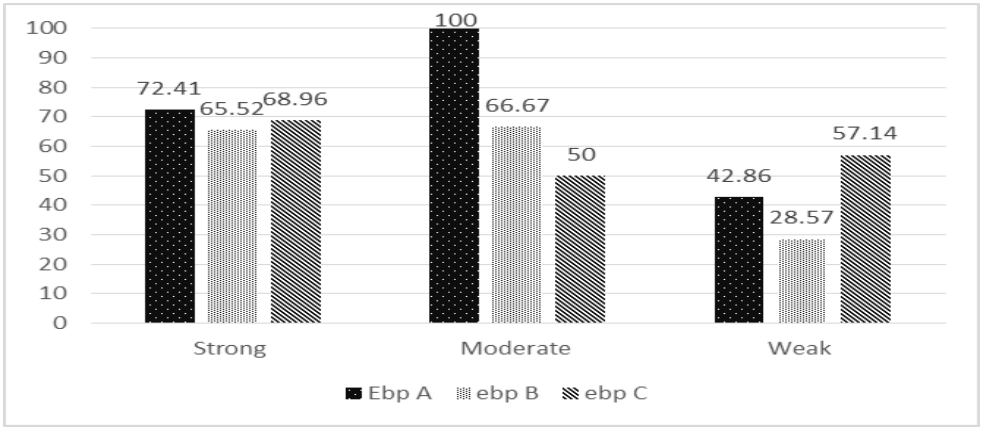
نمودار ۱. درصد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی در جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از گوشت قرمز

در جدایه‌های انسانی مقاومت نسبت به کوتریموکسازول ۱۰۰ درصد گزارش شد و نسبت به نیتروفورانتئین مقاومتی مشاهده نگردید. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی براساس واکنش بیوفیلم در نمودار ۲ نشان داده شده است. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر ارتباط معنی‌دار بین مقاومت به کوتریموکسازول و تولید بیوفیلم مشاهده گردید ($p < ۰/۰۵$). در مورد سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی ارتباط آماری بین مقاومت و تولید بیوفیلم مشاهده نشد.




نمودار ۲. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از موارد عفونت ادراری

از ۴۲ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از گوشت قرمز ژن *ebp A* در ۳۰ جدایه (۷۱/۴۳ درصد)، *ebp B* در ۲۵ جدایه (۵۹/۵۲ درصد) و *ebp C* در ۲۷ جدایه (۶۴/۲۸ درصد) گزارش گردید. فراوانی ژن های *ebp A*، *ebp B* و *ebp C* در جدایه هایی که بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف تولید می‌کردند در نمودار ۳ نشان داده شده است. براساس آزمون دقیق فیشر رابطه آماری معنادار بین ژن‌های *ebp* و تولید بیوفیلم جدایه *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از گوشت قرمز مشاهده نگردید ($p=۰/۸۶۶ > ۰/۰۵$).

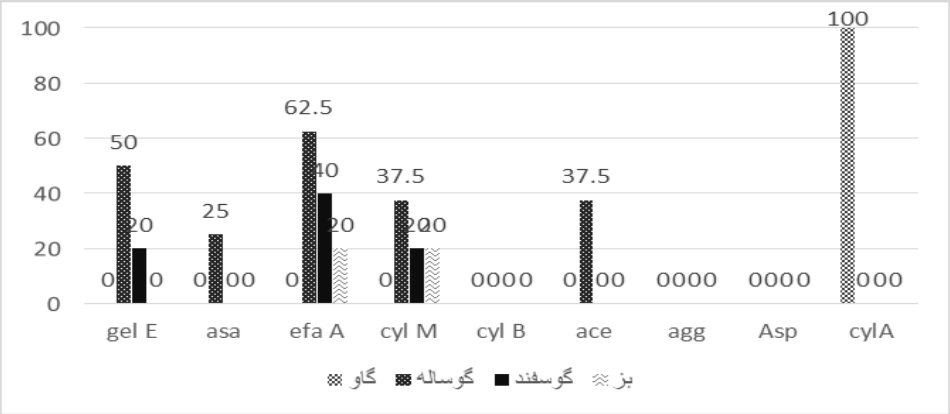



نمودار ۳. فراوانی ژن های *ebp A*، *ebp B* و *ebp C* در جدایه‌های تولید کننده بیوفیلم جدا شده از گوشت قرمز

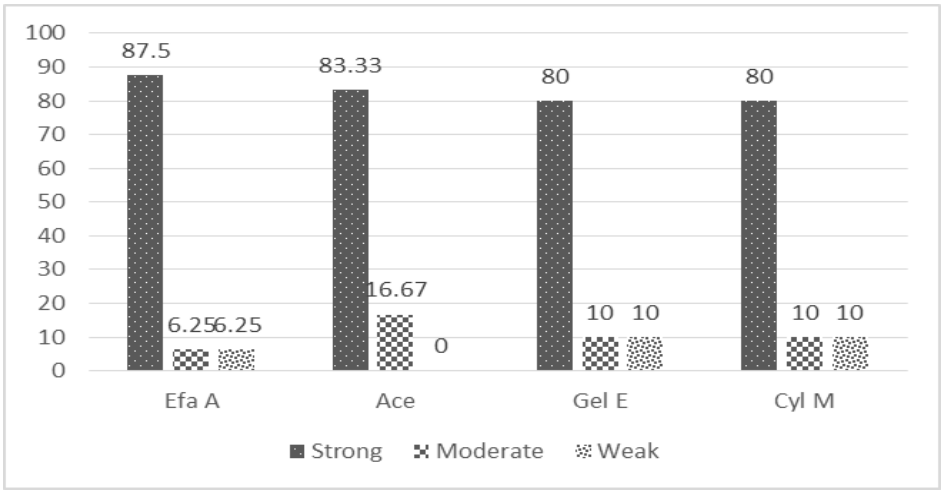
از ۵۰ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از موارد عفونت ادراری، ژن *ebp A* در ۴۵ جدایه (۹۰ درصد)، ژن *ebp B* در ۴۷ جدایه (۹۴ درصد) و ژن *ebp C* در ۴۶ جدایه (۹۲ درصد) گزارش گردید. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین فراوانی ژن‌های

*ebp A*، *ebp B* و *ebp C* و تولید بیوفیلم ارتباط معنی دار مشاهده شد ($p <$ ۰/۰۵).

فراوانی ژن‌های ویرولانس در جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* تولید کننده بیوفیلم جدا شده از گوشت قرمز در نمودارهای ۴ و ۵ نشان داده شده است.

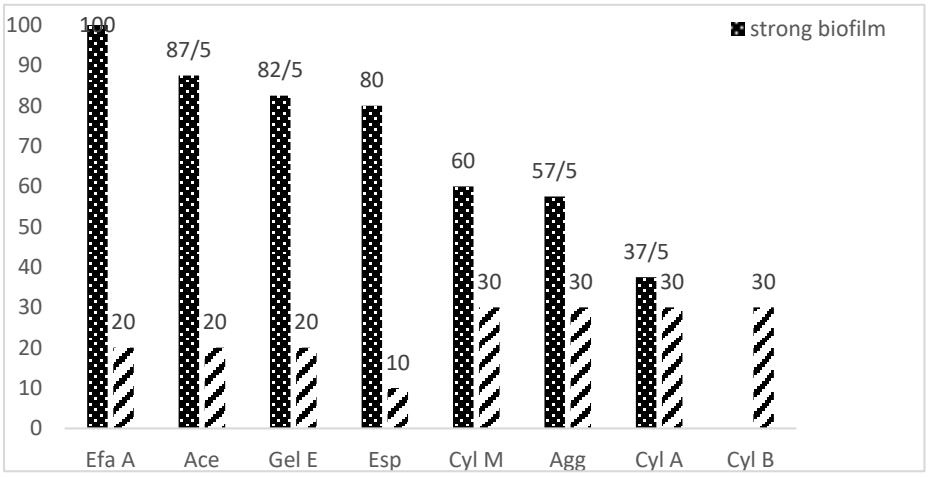



نمودار ۴. فراوانی ژن‌های ویرولانس در جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده ازگوشت قرمز




نمودار ۵. فراوانی ژن‌های ویرولانس در جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* تولید کننده بیوفیلم جدا شده ازگوشت قرمز

در این تحقیق از ۴۰ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از موارد عفونت ادراری که واکنش بیوفیلم قوی و متوسط تولید می‌کنند، ژن *efaA* در همه موارد (۱۰۰ درصد)، ژن *ace* در ۳۷ نمونه (۸۷/۵ درصد)، ژن *gel E* در ۳۵ نمونه (۸۲/۵ درصد)، ژن *esp* در ۳۳ نمونه (۸۰ درصد) ژن *cyl M* در ۲۷ نمونه (۶۰ درصد)، ژن *agg* در ۲۶ نمونه (۵۷/۵ درصد)، ژن *cyl A* در ۱۸ نمونه (۳۷/۵ درصد) و ژن *cyl B* در ۱۱ نمونه (۲۰ درصد) گزارش گردید.




نمودار ۶. فراوانی ژن‌های ویرولانس در جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* تولید کننده بیوفیلم جدا شده از ادرار

در تجزیه و تحلیل آماری با توجه آزمون دقیق فیشر بین نوع گوشت و نوع ژن ویرولانس رابطه معنی دار آماری مشاهده نگردید ($p$>۰/۰۵)، در صورتی‌که بین فراوانی ژن‌های *efa A*، *gel E*، *ace* و *esp* در جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از ادرار و تولید بیوفیلم ارتباط معنی‌دار مشاهده شد ($p$ <۰/۰۵).

**بحث**

*انتروکوک*‌ها گروه مهم و متنوعی از باکتری‌ها هستند که ارتباط پیچیده‌ای با انسان دارند. برخی از گونه‌ها در صنایع غذایی کاربرد داشته در حالی‌که تعدادی از آن‌ها باعث ایجاد بیماری‌های مختلف در انسان و حیوانات می‌گردند. شایع‌ترین عوامل مسبب بیماری‌های انسان در این گروه از باکتری دو گونه *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* می‌باشند. *انتروکوکوس* نه تنها یکی از اعضای مهم فلور نرمال دستگاه گوارش اکثر موجودات خونگرم نظیر انسان است، بلکه توانایی ایجاد زمینه‌های گسترده‌ای از بیماری‌های عفونی را دارا است و به‌عنوان یکی از عوامل عمده ایجادکننده عفونت‌های جدید بیماران بستری در بیمارستان مطرح می‌باشد. *انتروکوک‌ها* به عنوان یک باکتری مقاوم به بیشتر آنتی-بیوتیک‌های مصرفی در درمان بیماری‌ها شناخته شده است که به سبب موتاسیون و یا دریافت اجزاء ژنتیکی از طریق انتقال پلاسمیدها یا ترانسپوزون‌ها، توانایی بالایی درکسب مقاومت داشته است (Kühn et al., 2005).

*انتروکوک*‌ها اولین عامل عفونت در میان کوکسی‌های گرم مثبت عفونت زا در مجاری ادراری و سومین عامل عفونت باکتریایی در مجاری ادراری زنان در ایران پس از *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشند. آنتی-بیوتیک‌های مصرفی در محیط های بیمارستانی عاملی است که بر تعداد سویه‌های دارای مقاومت چند دارویی و بعضا سویه‌های مقاوم به همه آنتی‌بیوتیک‌ها می‌افزاید. مقاومت به ماکرولیدها در *انتروکوک*‌ها اهمیت اپیدمیولوژیکی زیادی در مناطق مختلف دنیا داشته است. در مناطق مختلف ایران و جهان به دلیل تغییرات ژنتیکی در سویه های ایجاد کننده و تفاوت در مصرف میزان آنتی‌بیوتیک‌ها و وجود اختلاف در میزان دسترسی به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف و جدید متفاوت می‌باشد. با این وجود افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری یک پدیده جهانی است. با توجه به این‌که انتروکوک‌ها یکی از اصلی‌ترین میکروارگانیسم‌ها در تشکیل بیوفیلم میکروبی بر روی سطوح و ابزار می‌باشد، زمینه مطالعات جدید، جهت بررسی سلامت عمومی از لحاظ بیماری‌های عفونی و هم‌چنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را فراهم می‌کند

Servais and Passerat, 2009; Bittencourt and ) .(Suzart, 2004; Tiwari et al., 2015

در تحقیق حاضر از ۱۰۰۰ نمونه ادرار مورد بررسی، آلودگی به *انتروکوکوس فکالیس* در ۵۰ نمونه تشخیص داده شد. مطالعات نشان می‌دهد که در اغلب موارد استقرار و پایداری باکتری‌ها به طور مستقیم به تولید بیوفیلم در مجاری ادراری بستگی دارد. هم‌چنین فراوانی ژن‌های *ebp A*، *ebp B* و *ebp C* در جدایه‌هایی که بیوفیلم قوی تولید می‌کردند، ۱۰۰ درصد و در جدایه‌هایی که بیوفیلم متوسط و ضعیف تولید می‌کردند ۵۰ درصد گزارش گردید. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین فراوانی ژن‌های *ebp A*، *ebp B* و *ebp C* و تولید بیوفیلم در جدایه-های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از عفونت‌های ادراری ارتباط معنی‌دار مشاهده شد. از ۴۲ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از گوشت ژن *ebp A* (۷۱/۴۳ درصد)، *ebp B* (۵۹/۵۲ درصد) و *ebp C* (۶۴/۲۸ درصد) گزارش گردید. براساس آزمون دقیق فیشر رابطه آماری معنادار بین ژن‌های *ebp* وتولید بیوفیلم جدایه *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از گوشت مشاهده نگردید.

در تحقیق انجام شده توسط Talebi و همکاران (۲۰۱۵) که بر روی ۵۸ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از منابع محیطی و ۳۲ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از دو بیمارستان در تهران صورت گرفت، توانایی تولید بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت بررسی و از ۵۸ جدایه جداسازی شده از نمونه‌های محیطی ۳۶ جدایه بیوفیلم قوی، ۳ جدایه بیوفیلم ضعیف و ۱۶ جدایه فاقد بیوفیلم گزارش شدند. در صورتی‌که در نمونه بیمارستانی ۲۳ جدایه بیوفیلم قوی، ۴ جدایه بیوفیلم ضعیف و ۵ جدایه فاقد بیوفیلم گزارش شدند. در این تحقیق در نمونه‌های بیمارستانی ژن *ebp A* در (۸۶ درصد)، ژن *ebp B* (۹۵ درصد) و ژن *ebp C* (۹۷ درصد) گزارش گردید. در نمونه‌های محیطی ژن *ebp A* (۹۱ درصد)، ژن *ebp B* (۹۴ درصد) و ژن *ebp C* (۹۱ درصد) گزارش گردید (Talebi et al., 2015) فراوانی ژن‌های *ebp* در تحقیق طالبی نسبت به تحقیق ما از فراوانی بالاتری برخوردار است. *انتروکوک*‌ها از جمله میکروارگانیسم-هایی هستند که عمدتا در روده‌ها یافت می‌شوند. حضور زیاد آن‌ها در مواد غذایی می‌تواند دلیلی بر آلودگی مدفوعی باشد. جنبه مفید این باکتری‌ها نقش پروبیوتیکی آن‌هاست و جنبه مضرشان نقش آن‌ها در مسمومیت غذایی است که مورد بحث است. طی مطالعات انجام شده، *انتروکوک*‌ها و کلی فرم‌ها به عنوان دو شاخص 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 آن-ها در مواد غذایی بیانگر وضعیت نامطلوب بهداشتی است. بررسی و جداسازی *انتروکوک*‌ها به‌عنوان یکی از شاخص‌های بهداشتی در سایر مواد غذایی غیر از لبنیات نیز گزارش شده است. Barbosa و همکاران (۲۰۱۰) درشمال پرتغال نیز جداسازی ۱۸۲ ایزوله *انتروکوک* از فرآورده های گوشتی تخمیری سنتی را گزارش نمودند که بیشترین ایزوله ها 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 (Barbosa et al., 2010). محققین دیگر نیز جداسازی انواعی از *انتروکوک*‌ها را از مواد غذایی هم‌چون فرآورده‌های تخمیری سویا، انواعی ازفرآورده های تخمیری گیاهی محصولات آبزیان و فرآورده‌های دریایی گزارش نموده اند.

در تحقیق حاضر آلودگی به باکتری *انتروکوکوس فکالیس* در نمونه‌های گوشت مورد بررسی ۴۰/۳۸ درصد گزارش گردید که آلودگی به گوشت گاو ۱۴/۳ درصد، به گوشت گوساله ۳۸/۱ درصد، به گوشت

گوسفند و بز ۲۳/۸ درصد برآورد گردید که در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون کای دو بین دو نوع گوشت و آلودگی به *انتروکوکوس فکالیس* رابطه معنی دار آمار مشاهده گردید. با تحقیقات بیشتر عوامل بیماری‌زایی در *انتروکوکوس فکالیس* شناخته شده است که هر کدام از این فاکتورها نقش ویژه‌ای در ایجاد بیماری ناشی از این باکتری دارند. این فاکتورها به‌طور همگرا عمل می‌کنند که منجر به افزایش ویرولانس می‌شود و سبب تخریب و تهاجم بافتی می‌گردد. صفاتی که باعث افزایش عامل بیماری‌زایی می‌شود به‌طور معمول شامل سیتولیزین، فاکتور تجمعی (فرمون)، ادهزین، سوپراکسیداز خارج سلولی، پروتئین سطحی خارج سلولی، همولیزین و ژلاتیناز می‌باشد. پروتئین‌هایی همچون همولیزین، ژلاتیناز و فاکتور تجمعی در سیستم‌های تبادل پلاسمیدی شرکت دارند. این پروتئین‌ها به همراه سایر فاکتورها در بیماری‌زایی *انتروکوک‌ها* شرکت دارند هرچند نقش آن‌ها در عفونت زایی نامشخص باقی مانده است. حدس زده می‌شود که این فاکتورها به طور هم گرایی به واسطه فعال نمودن کروم سنسینگ[1] ویرولانس باکتری را افزایش می‌دهد. این امر منجر به صدمات بافتی و تهاجم عمقی تر باکتری می‌شود. پروتئین ماده تجمعی که حامل ژن *asa1* در *انتروکوک‌ها* است در پاسخ به فرمون‌های جنسی تولید شده که باعث جذب این باکتری‌ها به یکدیگر و ایجاد توده سلولی می‌گردد. هم‌چنین این ماده نقش مهمی در تحریک چسبندگی، تهاجم به سلول و تخریب بافت‌های میوکارد و ریه ایفا می‌کند (Shokoohizadeh et al., 2018).

پروتئین سطحی انتروکوکی وظایف تقریبا مشابه با ماده تجمعی دارد عامل اتصال به کلاژن در اتصال باکتری به کلاژن و لامینین سلولی نقش داشته و موتاسیون در آن سبب کاهش ایجاد اندوکاردیت و عفونت ادراری می‌شود. پروتئین سطحی انتروکوک که توسط ژن *esp* کروموزومی رمزدهی می‌شود با افزایش بیماری‌زایی، کلونیزاسیون، پایداری در مجاری ادراری و تشکیل بیوفیلم همراه است. نقش پروتئین سطحی در کلونیزه شدن و بقای *انتروکوکوس فکالیس* در عفونت‌های مجاری ادراری در مدل‌های حیوانی نشان داده شده است. پروتئین سطحی در مقادیر بالا، در جدایه‌های مولد اندوکاردیت و باکتریمی مشاهده شده ولی به ندرت در جدایه‌های مدفوعی افراد سالم مشاهده می‌گردد (Shokoohizadeh et al., 2018). عوامل بیماری‌زایی هم‌چون همولیزین سایتولیزین که حدود ۳۲ درصد از گونه‌های *انتروکوک فکالیس* واجد آن بوده و بر روی پلاسمیدهای پاسخ به فرومون و یا جزایر پاتوژنیسته کدگذاری و سبب لیز گلبول‌های قرمز و سفید می‌گردد. تولید سیتولیزین به طور قابل توجهی شدت اندوکاردیت و اندوافتالمیت را در مدل حیوانی تشدید نموده و باعث شدت بیماری انتروکوکی در انسان می‌گردد. ژن‌های سیتولیزین خاموش از جدایه‌های بالینی *انتروکوکوس فکالیس* ممکن است یک پروفیل منفی فنوتیپی را نشان دهد، یعنی فعالیت همولیتیک بر روی محیط آگار خون‌دار باشد، ولی فاکتورهای محیطی نظیر آن‌چه که در محل عفونت رخ می‌دهد ممکن است باعث فعالیت ژن‌ها گردد. آنزیم ژلاتیناز، توسط ژن *gelE* کروموزومی رمزدهی می‌شود. این آنزیم یک متالوپروتئاز روی خارج سلولی است که کلاژن، ژلاتین و پپتیدهای کوچک را هیدرولیز می‌کند و در تشکیل اندوکاردیت در مدل‌های حیوانی نقش دارد. ژلاتیناز سبب آسیب به بافت میزبان و کاهش پاسخ سیستم ایمنی شده و در فعال نمودن اتولیزین‌ها و تخریب پپتیدوگلیکان و متعاقب آن آزاد شدن DNA و تشکیل بیوفیلم نقش دارد. *انتروکوکوس فکالیس* واجد ژن‌های ژلاتیناز در حدود ۳۳ درصد مربوط به بیماران مبتلا به اندوکاردیت شناسایی گردیده است. هیالورونیداز سبب تخریب هیالورونیک اسید شده و در

1 - quorum-sensing

انتشار باکتری در محل عفونت اولیه نقش مهمی ایفا می‌نماید.

در این تحقیق از ۴۰ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از موارد عفونت ادراری که واکنش بیوفیلم قوی و متوسط تولید می‌کنند، ژن *efa A* ۱۰۰ درصد، ژن *ace* ۸۷/۵ درصد، ژن *gel E* ۸۲/۵ درصد، ژن *esp* ۸۰ درصد، ژن *cyl M* ۶۰ درصد، ژن *agg* ۵۷/۵ درصد، ژن *cyl A* ۳۷/۵ درصد و ژن *cyl B* ۲۰ درصد گزارش گردید. در صورتی که از ۱۰ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از موارد عفونت ادراری که قادر به تولید بیوفیلم نبودند، فراوانی ژن‌های *efa A*، *ace* و *gel E* ۲۰ درصد، ژن‌های *cyl M*، *agg*، *cyl A* و *cyl B* ۳۰ درصد و ژن *esp* ۱۰ درصد گزارش گردید. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین فراوانی ژن‌های *efa A*، *gel E*، ace و *esp* و تولید بیوفیلم ارتباط معنی‌دار مشاهده شد. در تحقیق حاضر در نمونه‌های گوشت مورد بررسی، ژن *efa A* بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد (۳۸ درصد)، *cyl M* و *gel E* (۲۳/۸ درصد)، *cyl A* و *ace* (۱۴/۲۸ درصد) و *asa* (۹/۵۲ درصد) گزارش گردید. ژن‌های *agg* و *asp* در هیچ جدایه‌ایی یافت نشدند. فراوانی ژن‌های ویرولانس در جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از گوشت نسبت به جدایه‌های جدا شده از موارد عفونت ادراری کمتر بود.

در تحقیق Samadi Kafil و همکاران (۲۰۱۵) که بر روی ۱۹۶ جدایه انتروکوکوس (۱۱۰ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* و ۸۶ جدایه *انتروکوکوس فاسیوم*) انجام شد، ژن *esp* در ۱۴۷ جدایه (۷۵ درصد)، ژن *asa* در ۷۶ جدایه (۳۸/۷۷ درصد)، ژن *ace* در ۱۶۵ جدایه (۱۸/ ۸۴ درصد)، ژن *efa A* در ۱۶۰ جدایه (۸۱/۶۳ درصد) و ژن *cyl A* در ۶۷ جدایه (۳۴/۱۸ درصد) گزارش گردید. در این تحقیق بین تولید بیوفیلم و ژن‌های *asa* و *efa A* ارتباط آماری معنی دار گزارش گردید. در صورتی‌که بین تولید بیوفیلم و ژن *esp* ارتباطی مشاهده نگردید (Samadi Kafil and Mohabati, 2015). در تحقیق Gozlan و همکاران (۲۰۱۵) که بر روی ۵۵ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* صورت گرفت، ۴۱ جدایه (۷۵ درصد) دارای ژن‌های ویرولانس و ۱۴ جدایه (۲۵ درصد) فاقد ژن‌های ویرولانس بودند. ژن‌های *cyl A*، *ace* و *hly A* در هیچ کدام از جدایه‌ها مشاهده نگردید. در این تحقیق ژن *efa A* در همه موارد (۱۰۰ درصد)، ژن *ace* در ۳۷ نمونه (۷۴ درصد)، ژن *gel E* در ۳۵ نمونه (۷۰ درصد)، ژن *esp* در ۳۳ نمونه (۶۶ درصد) ژن *cyl M* در ۲۷ نمونه (۵۴ درصد)، ژن *agg* در ۲۶ نمونه (۵۲ درصد)، ژن *cyl M* در ۲۵ نمونه (۵۰ درصد)، ژن *cyl A* در ۱۸ نمونه (۳۶ درصد) و ژن *cyl B* در ۱۱ نمونه (۲۲ درصد) گزارش گردید (Gozalan et al., 2015). فراوانی ژن‌های ویرولانس در این تحقیق نسبت به فراوانی ژن‌های ویرولانس در تحقیق ما بالاتر می‌باشد.

در تحقیق Kristich و همکاران (۲۰۰۴) نشان داده شده است که سویه فاقد پروتئین سطحی قادر است سطوح بی‌جان مستقل از پروتئین سطحی انتروکوک تشکیل بیوفیلم دهد و ژلاتیناز باعث افزایش تشکیل بیوفیلم در *انتروکوکوس فکالیس* می‌گردد. هم‌چنین مشخص شده که پروتئین سطحی انتروکوک برای تشکیل بیوفیلم ضروری نبوده ولی وجود آن برای تشکیل مقادیر بالایی از بیوفیلم همراه بوده است (Kristich et al., 2004). مطالعه Seno و همکاران (۲۰۰۵) نشان داد که بین وجود پروتئین سطحی انتروکوک، ژلاتیناز و توانایی سویه‌ها در تشکیل بیوفیلم در شرایط آزمایشگاهی ارتباط قوی وجود دارد (Seno et al., 2005). Heikens و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که پروتیئن Esp در تولید بیوفیلم و کلونیزاسیون باکتری نقش ندارد و از آنجا که اوپرون سیتولیزین ارتباط نزدیکی با ژن *esp* دارد، لذا سیتولیزین نیز در تولید بیوفیلم نقشی ندارد (Heikens et al., 2009). اما عده ایی از محققان

معتقدند که ژن *esp* در تولید بیوفیلم نقش دارد (Paganelli et al., 2012). در تحقیق حاضر بین تولید بیوفیلم و ژن *esp* در ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از موارد عفونت ادراری ارتباط آماری معنی دار گزارش گردید.

در مطالعه انجام شده توسط Zhengv و همکاران (۲۰۱۸) که بر روی ۱۱۳ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* صورت گرفت، تولید بیوفیلم در ۵۰/۴۰ درصد نمونه‌ها گزارش گردید که نسبت به سایر مطالعات کمتر می‌باشد در این تحقیق نیز بین تولید بیوفیلم و ژن *esp* ارتباطی مشاهده نگردید (Zhengv et al., 2018). بعضی از مطالعات حاکی از آن است که *gel E* در تولید بیوفیلم موثر می‌باشد (Park et al., 2007; Kayaoglu and Orstavik, 2018)، اما مطالعات دیگر نیز نشان می‌دهد که *gel E* در تولید بیوفیلم نقش ندارد (Seno et al., 2005; Heikens et al., 2009). در مطالعه Zhengv و همکاران (۲۰۱۸) تولید بیوفیلم در جدایه‌های *gel* E منفی بیشتر گزارش گردید (Zhengv et al., 2018). در تحقیق حاضر بین تولید بیوفیلم و ژن *gel* E در ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از موارد عفونت ادراری ارتباط آماری معنی دار گزارش گردید

## نتیجه گیری کلی

مطالعات حاصل این تحقیق نشان می‌دهد که جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از موارد عفونت ادراری نسبت به سویه‌های جدا شده از گوشت، هم از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی و هم از نظر فاکتورهای ویرولانس فراوانی بیشتری دارند و در بسیاری از موارد جدایه‌های جدا شده از موارد عفونت ادراری بین تولید بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی و یا فاکتورهای ویرولانس ارتباط آماری معنی دار مشاهده گردید. بررسی اختلافات مولکولی از نظر تیپ بندی مولکولی سویه‌ها می‌تواند اطلاعات دقیق‌تری نسبت به منبع اصلی آلودگی و تیپ مولکولی هرکدام از سویه‌های باکتری بیان کند. در انتخاب روش یا روش‌های تیپ‌بندی باید قدرت تفکیک، تکرارپذیری، سادگی روش، وسعت کاربرد، سرعت انجام و سادگی تفسیر داده‌ها را توجه نمود. روش‌های مولکولی جدید برخلاف روش‌های فنوتیپی که مبتنی بر بررسی ویژگی‌های ظاهری و تغییرپذیر می‌باشند، بر بررسی ترادف تغییرناپذیر یا کمتر تغییرپذیر ژنی میکروارگانیسم هدف، استوار بوده و کمتر تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند. این روش‌ها نسبت به روش‌های سنتی واجد قدرت افتراق‌دهی بالاتر، کاربرد گسترده‌تر برای انواع مختلف گونه‌های میکروبی و سرعت بالاتر می‌باشند.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان، صمیمانه از زحمات معاونت محترم پژوهشی و جناب آقای مهندس منوچهر مومنی تشکر و قدردانی به عمل می آورند.

## منابع

1. Aarestrup F.M., Bager F., Jensen N.E., Madsen M., Meyling A., Wegener H.C. 2009. Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. APMIS 106: 606–622.

2. 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 Control. 21(5): 651-656.

3. Billington E,. Phang S., Gregson D., et al. 2014. Incidence, risk factors, and outcomes for Enterococcus spp. blood stream infections: a population-based study. Int J Infect Dis. 26:76–82.

4. Bittencourt M.E, and Suzart S. 2004. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. J Med Microbiol. 53(11):1069-73.

5. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S25. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017.

6. Giraffa G. 2002. Enterococci from foods. FEMS Microbiol. 26: 163– 171.

7. Gozalan A., Coskun-Ari F.F., Ozdem B., Unaldi O., Celikbilek N., Kirca F. Aydogan S. Muderris T., Guven T., Acikgoz1 A., Durmaz R. 2015. Molecular characterization of vancomycin-resistant 39. *Enterococcus faecium* strains isolated from carriage and clinical samples in a tertiary hospital, Turkey. J Med Microb. 64: 759–766.

8. Heikens E., Leendertse M., Wijnands L.M., van Luit-Asbroek M., Bonten M.J., van der Poll T., Willems R.J. 2009. Enterococcal surface protein Esp is not essential for cell adhesion and intestinal colonization of *Enterococcus faecium* in mice. BMC Microbiology. 9(1): 19.

9. Ispirli H., Demirbaş F., Dertli E. 2017. Characterization of Functional Properties of Enterococcus Spp. Isolated from Turkish White Cheese. LWT-Food Science and Technology. 75: 358–365.

10. Kuhn I., Iversen I., Finn M., Greko C., Burman L.G., Blanch A.R. et al. 2005. Occurrence and relatedness of Vancomycin-Resistant *Enterococci* in Animals, Humans, and the Environment in Different European regions. Appl Environ Microbiol. 71(9): 5383-5390.

11. 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.

12. Kayaoglu G., and Orstavik D. 2004. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med.15 (5): 308–320.

13. Manero A., and Blanch A.R. 1999. Identification of *Enterococcus spp*. with a biochemical key Appl Environ Microbiol. 65(10): 4425-30.

14. Medeiros A.W., Pereira R.I., Oliveira D.V., Martins P.D., Azevedo P.A.D, Van der Sand S. Frazzon J., Frazzon A.P.G. 2014. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. Braz J Microb. 45(1): 327-332.

15. Momeni, H., Raissy, M., Bashiri, M., Barzegar, M. Ansari, M. 2020. Fish-borne parasites: A review on the reports from Iran. J Food Microbiol. 6 (4): 88-102.

16. Nallapareddy S.R., Singh K.V., Sillanpaa J., Danielle A., Magnus Höök G., Stanley L., Erlandsen Murray B.E. 2006. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. J Clin Invest. 116 (10): 2799–2807.

17. Nielsen H.V., Flores-Mireles A.L., Kaua A.L., Kline K.A., Pinkner J.S., Neiers F., Normark S., Normark B.H., Caparon M.G., Hultgrena S.J. 2013. Pilin and Sortase Residues Critical for Endocarditis- and Biofilm-Associated Pilus Biogenesis in *Enterococcus faecalis.* J Bacteriol. 195(19): 4484-4495.

18. Park S.Y., Kim K.M., Lee J.H., Seo S.J., Lee I.H. 2007. Extracellular gelatinase

19. of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. Infect Immun. 75: 1861–186.

20. Paganelli F.L. Willems R.J., Leavis H.L. 2012. Optimizing future treatment of enterococcal infections: attacking the biofilm? Trends in Microbiology. 20 (1):40–49.

21. Pereira RI., Prichula J., Santestevan NA., Dzevedo P.A., Motta A., Frazzon A.P.G. 2017. Virulence profiles in Enterococcus spp. isolated from raw buffalo's milk in south Brazil. Res J Microbiol Dubai.12 (4):248-54.

22. Rahimi F. Talebi M. Saifi M. Pourshafie M.R. 2008. Genetic and biochemical study of *Enterococci* species isolated from Sewage Tehran with an emphasis on strains has gene vanA and vanB. J Infec Dis.13(42): 31-37.

23. Raafat S. A., Abo-Elmagd E.K., Awad., R.A. Hassan., E.M.2016. Prevalence of Vancomycin Resistant Enterococci in Different Food Samples. Egyptian Journal of Med Microbiol. 25(4): 47–55

24. Sambrook J., and Russell D.W. 2001. Molecular cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 58-152.

25. Semedo T., Santos M.A., Lopes M.F.S., Marques J.F.M., Crespo M.T.B., Tenreiro R. 2003. Virulence factors in food, clinical and reference *enterococci*: a common trait in the genus? System and Applied Microb. 26(1): 13-22.

26. Servais P. and Passerat J. 2009. Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). Sci Total Environ. 408 (2): 372-365.

27. Shokoohizadeh L., Ekrami A., Labibzadeh M., Liaqat A., Alavi S.M., 2018. Antimicrobial resistance patterns and virulence factors of *enterococci* isolates in hospitalized burn patients. BMC Res Notes. 11(1): 1.

28. Samadi Kafil H and Mobarez A. 2015. Assessment of biofilm formation by *enterococci* isolates from urinary tract infections with different virulence profiles. J King Saud Univ Sci. 27: 312–317.

29. Seno Y., Kariyama R., Mitsuhata R., Monden K., Kumon H. 2005. Clinical implications of biofilm formation by *Entrococcus faecalis* in the urinary tract. Acta Med Okayama. 59 (3): 79 -87.

30. Talebi M., Asghari N., Moghadam Z.M., Enayati M., Saifi M., Pourshafie M.R. 2015. Antibiotic resistance and biofilm formation of *Enterococcus faecalis* in patient and environmental samples. Jundishapur j Microb. 8(10): e23349.

31. Tiwari K., Banerjee T., Filgona J., S. Anupurba S. 2015. Study of virulence factors in association with antimicrobial resistance amongst urinary isolates of enterococci, Indian Journal of Medical Microbiology. 33 (3) 455–456

32. Zhengv J.x., Bai B., Lin Z.W., Pu Z.Y., Yao W.M., Chen Z., Li D.Y., Deng X.B., Deng Q.W., Yu Z.J. 2018. Characterization of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* isolates derived from urinary tract infections in China. J Med Microbiol. 67 (3): 60–67.

# Comparison of antibiotic resistance and virulence factors in *Enterococcus faecalis* isolates isolated from animal and human sources, in 2018

**Shahveh M[1], Tajbakhsh E[1*], Momtaz H[1], Ranjbar R[2و1]**

1. Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Molecular Biology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

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

Received: 12 August 2020 Accepted: 12 November 2020

## Abstract

Enterococci are an important and diverse group of bacteria that are known to be resistant to most antibiotics used to treat diseases. In this cross-sectional study, 104 samples of red meat and 1000 urine samples suspected of urinary tract infection in the border city of Kermanshah were examined for *Enterococcus faecalis*. First, the samples were approved by biochemical and molecular methods, then in order to evaluate their ability to produce biofilm, Microtiter Plate method was used, and their sensitivity to antibiotics was also determined by Kirby-Bayer method. *Enterococcus faecalis* infection in human samples and red meat samples was reported to be 5% and 40.38%, respectively. In the strains isolated from red meat samples, the highest resistance was observed against Streptomycin, while the lowest resistance was to Vancomycin. In the human isolate samples, the highest resistance was reported to be to Co-trimoxazole, while the lowest resistance was to Nitrofurantoin. In strains isolated from red meat, *ebp A, ebp B* and *ebp C* were reported to be 71.43%, 59.52% and 64.28%, respectively. No statistically significant relationship was observed between biofilm production and *ebp* genes in these isolates. However, a significant relationship was detected between ebp genes and biofilm production in strains isolated from urine. Similarly, it was reported that there was no statistically significant relationship between the meat type and the virulence gene type. But, the findings of the study showed a significant relationship between the frequency of *efa A, gel E*, ace and *esp* genes.

**Keywords:** *Enterococcus faecalis*, Biofilm, Virulence factors, Antibiotic Resistance, Meat, Urinary Tract Infection.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited Copyright © 2021 Shahrekord Branch, Islamic Azad University