

بررسی فراوانی فاکتورهای حدت در ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از همبرگرراضیه مهدیان<sup>۱</sup>، الهه تاج بخش<sup>۲\*</sup>، زهرا بم زاده<sup>۲</sup>

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

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

\* نویسنده مسئول: ee\_tajbakhsh@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۲۹

## چکیده

*انتروکوکوس*ها از جمله میکروارگانیسم‌هایی هستند که عمدتاً در روده‌ها یافت می‌شوند. حضور زیاد آن‌ها در مواد غذایی می‌تواند دلیلی بر آلودگی مدفوعی باشد و از انواع مواد غذایی مانند سبزیجات، گوشت و غیره جدا شده‌اند. از بین مواد غذایی همبرگر از جمله محصولات است که به‌صورت دست‌ساز و به‌طور گسترده توسط اقشار مختلف مردم استفاده می‌شود. در این تحقیق تعداد ۵۰ نمونه همبرگر با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی از نظر وجود *انتروکوکوس فکالیس* مورد بررسی قرار گرفتند. به‌منظور ردیابی ژن‌های *ویرولان* در حضور زوج پرایمرهای اختصاصی با رعایت برنامه دمایی واکنش PCR صورت گرفت. از سویه استاندارد *انتروکوکوس فکالیس* ATCC 29212 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. در این تحقیق از مجموع ۵۰ نمونه مورد مطالعه تعداد ۳۳ نمونه (۶۶ درصد) آلوده به باکتری *انتروکوکوس فکالیس* تشخیص داده شدند. از ۳۳ ایزوله *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از همبرگر، ژن *efaA* در ۸ ایزوله (۲۴/۲۴ درصد)، ژن *cylA* در ۱۵ ایزوله (۴۵/۴۵ درصد)، ژن *gel E* در ۹ ایزوله (۲۷/۲۷ درصد)، ژن *esp* در ۲ ایزوله (۶/۰۶ درصد)، ژن *agg* در ۲ ایزوله (۶/۰۶ درصد)، و ژن‌های *aca*، *asa* و *cylB* در هیچ یک از ایزوله‌ها مشاهده نگردید. *انتروکوکوس*ها و کلی فرم‌ها به‌عنوان دو شاخص مهم بهداشتی مطرح هستند. با توجه به این که حضور زیاد *انتروکوکوس*ها در مواد غذایی می‌تواند دلیلی بر آلودگی مدفوعی باشد، نتایج حاصل از این تحقیق نشان دهنده آلودگی زیاد همبرگرهای عرضه شده در شهرستان شهرکرد می‌باشد.

کلید واژه‌ها: *انتروکوکوس فکالیس*، همبرگر، ژن‌های *ویرولان*.

## مقدمه

یافته است. روش فرآوری سنتی، دمای نگهداری نامناسب و بهداشت ضعیف شخصی که در تهیه غذا دخالت دارد، برخی از علل اصلی آلودگی غذاهای آماده مصرف هستند. طی مطالعات انجام شده، *انتروکوکوس*ها و کلیفرم‌ها به‌عنوان دو شاخص مهم بهداشتی مطرح هستند. تراکم بیش از حد مجاز آن‌ها در مواد غذایی بیانگر وضعیت نامطلوب بهداشتی است (رسولی پیروزیان و همکاران، ۱۳۸۷، قاسمی و همکاران، ۱۳۸۷، میرحسینی ۱۳۹۱). باکتری‌های جنس *انتروکوکوس*<sup>۲</sup>، ارگانیسم‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی، تخم مرغی شکل و غیر اسپورزا، بی-

انواع مختلفی از غذاهای آماده مصرف<sup>۱</sup> در کشورها با توجه به زمینه‌های فرهنگی و اجتماعی متفاوت، وجود دارد که به دلیل تنوع زیاد، در دسترس بودن، عدم نیاز به زمان پخت و قیمت‌های نسبتاً ارزان باعث افزایش تقاضا در بین مردم شده‌اند. اگرچه دارای مزایایی می‌باشند اما ممکن است یک تهدید برای سلامت عمومی به شمار روند. تقاضا برای مواد غذایی سالم و بی خطر و عدم نیاز به آماده سازی و کار کردن با دست، منجر به افزایش تولید و مصرف غذاهای آماده مصرف شده است و مصرف کنندگان پر مشغله‌ی امروزه راحت‌تر می‌باشند، لذا مخاطرات میکروبیولوژیکی ناشی از مصرف این محصولات افزایش

2- *Enterococci*

1- Ready-To-Eat (RTE)

باعث بقای باکتری در مئانه و ایجاد عفونت‌های مجاری ادراری می‌شود. ویروالانس این ارگانیزم با تنظیم ژن‌های کد کننده ویروالانس که بر روی ژنوم در ناحیه مشخصی به نام جزایر پاتوژنیسیته<sup>۱۴</sup> می‌باشند، تنظیم می‌گردد (Eton and Gasson., 2001; Feglo et al., 2012; Fukushima et al., 1997; Huycke et al., 1998; Hurlbert et al., 1998). تحقیق حاضر به منظور بررسی میزان آلودگی همبرگرهای عرضه شده به بازار مصرف شهر کرد به باکتری *انتروکوکوس فکالیس* و بررسی فراوانی فاکتورهای ویروالانس صورت گرفت.

### روش کار

در این مطالعه توصیفی مقطعی در سال ۱۳۹۶ تعداد ۵۰ عدد همبرگر صنعتی از برندهای (شماره ۹-۱) با درصدهای گوشت مختلف از مراکز عرضه همبرگر در شهرستان شهرکرد تهیه و در شرایط استریل به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید. از سویه استاندارد *انتروکوکوس فکالیس*<sup>۱۵</sup> ATCC 29212 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. برای جداسازی باکتری‌های *انتروکوکوس* از محیط کشت اختصاصی کانامایسین اسکولین آزید آگار استفاده گردید. برای این منظور از هر نمونه همبرگر ۵ گرم توزین و با ۱۰ میلی لیتر بافر نمکی فسفات مخلوط و یکنواخت گردید. سپس مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از محلول مورد نظر در یک پلیت حاوی محیط کانامایسین اسکولین آگار پخش گردید و به مدت ۲۴h در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند. کلونی‌های رشد یافته در هر پلیت پس از سپری شدن مدت انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفتند. تمام سویه‌ها از نظر رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، اکسیداز، رشد در حضور ۶/۵ درصد نمک و تخمیر قندهای آرابینوز، مانیتول، سوربیتول، لاکتوز و سوربوز تعیین هویت گردیدند (Jett et al., 1994).

هوازی اختیاری، جور تخمیر<sup>۳</sup> با احتیاجات غذایی پیچیده هستند که اغلب در اکثر سبزیجات، گیاهان و مواد غذایی مخصوصا غذاهای با منشاء حیوانی حضور دارند. آن‌ها هم-چنین قسمتی از فلور میکروبی طبیعی روده بعضی از پستانداران و انسان را تشکیل می‌دهند. *انتروکوکوس فکالیس*<sup>۴</sup>، *انتروکوکوس فاسیوم*<sup>۵</sup> و *انتروکوکوس دورانس*<sup>۶</sup> گونه‌هایی هستند که بیشترین فراوانی را در بین سایرگونه‌ها به خود اختصاص داده و به-طور فراوان در غذاهایی با منشاء حیوانی یافت می‌شوند (Barbosa et al., 2010; Bettencourt et al., 2004).

*انتروکوکوس فکالیس* ابتدا تحت جنس *استریپتوکوکوس* بود ولی در سال ۱۹۸۴ *انتروکوکوس* با استفاده از مطالعات هیبریداسیون DNA در جنس جداگانه قرار گرفت اندازه ژنوم این باکتری ۱۵۰ کیلو جفت باز می‌باشد و درصد G+C این باکتری ۳۲/۲ درصد می‌باشد (Chow et al., 2003; Cosentino et al., 2010). در این باکتری چندین فاکتور ویروالانس شناسایی شده که شامل ماده تجمع<sup>۷</sup>، پروتئین سطحی *انتروکوک*<sup>۸</sup>، همولایزین<sup>۹</sup>، ژلاتیناز<sup>۱۰</sup>، فاکتور اتصال<sup>۱۱</sup> سطحی *انتروکوک*<sup>۱۱</sup>، آنتی ژن A *انتروکوکوس فکالیس*<sup>۱۲</sup> و سیتولیزین *انتروکوک*<sup>۱۳</sup> می‌باشد. ژلاتیناز یک پروتئین است که توسط *انتروکوکوس فکالیس* تولید شده و قادر است ژلاتین، کلاژن، کارژین و دیگر پپتیدها را هیدرولیز کند. یک لوکوس بیان ژن آن را برعهده دارد. چسبندگی سطحی یا پروتئین سطحی *انتروکوک* از جمله دیگر فاکتورهای ویروالانس است که این پروتئین در دیواره سلولی باکتری قرار گرفته است. توالی ژن‌های کد کننده این پروتئین در نمونه‌های کلینیکی بیش از نمونه‌های کومنسال است. این پروتئین

3- Homofermentative

4- *Enterococcus faecalis*

5- *Enterococcus faecium*

6- *Enterococcus durans*

7- Aggregation substance (*agg*)

8- Enterococcal surface protein (*esp*)

9- Hemolysine (*hly*)

10- Gelatinase (*gel*)

11- Enterococcal surface adhesion (*eca*)

12- *Enterococcus faecalis* antigen A (*efa*)

13- Cytolysine (*cyl*)

14 - Pathogenicity Islands

15- Asian Type Culture Collection

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

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

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

به منظور تأیید قطعی *انتروکوکوس فکالیس* در نمونه‌های مورد بررسی، از آزمایش PCR در حضور زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول (۱)، ردیابی ژن *16srRNA* استفاده شد (Koluman et al., 2009). استخراج DNA با استفاده کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن)<sup>۱۶</sup> مطابق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. برای ردیابی شایع‌ترین ژن‌های ویروالانس شامل *agg esp*، *eca*، *gel E*، *efaA* و *cyl A, B, M* از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول (۱) استفاده شد.

<sup>16</sup>- DNPTM(CinnaGen)

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

Gene	PCR progame	PCR Volume (50 $\mu$ L)
<i>16srRNA</i>	1 cycle: 95 <sup>0C</sup> ----- 5 min. 31 cycles: 95 <sup>0C</sup> ----- 45 s 59 <sup>0C</sup> ----- 60 s 72 <sup>0C</sup> ----- 60 s 1 cycle: 72 <sup>0C</sup> ----- 5 min	5 $\mu$ L PCR buffer 10X 2 mM Mgcl2 200 $\mu$ M dNTP (Fermentas) 0.4 $\mu$ M of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 $\mu$ L DNA template
<i>Asa, gel E</i>	1 cycle: 95 <sup>0C</sup> ----- 5 min. 30 cycles: 95 <sup>0C</sup> ----- 30 s 51 <sup>0C</sup> ----- 30 s 72 <sup>0C</sup> ----- 60 s 1 cycle: 72 <sup>0C</sup> ----- 6 min	5 $\mu$ L PCR buffer 10X 2.5 mM Mgcl2 200 $\mu$ M dNTP (Fermentas) 0.5 $\mu$ M of each primers F & R 2 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 $\mu$ L DNA template
<i>Cyl A, cyl M, efa A</i>	1 cycle: 95 <sup>0C</sup> ----- 6 min. 30 cycles: 94 <sup>0C</sup> ----- 60 s 55 <sup>0C</sup> ----- 60 s 72 <sup>0C</sup> ----- 45 s 1 cycle: 72 <sup>0C</sup> ----- 7 min	5 $\mu$ L PCR buffer 10X 2.5 mM Mgcl2 300 $\mu$ M dNTP (Fermentas) 0.4 $\mu$ M of each primers F & R 2 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 $\mu$ L DNA template
<i>Cyl B, ace, agg, esp</i>	1 cycle: 94 <sup>0C</sup> ----- 6 min. 35 cycles: 95 <sup>0C</sup> ----- 60 s 54 <sup>0C</sup> ----- 90 s 73 <sup>0C</sup> ----- 45 s 1 cycle: 72 <sup>0C</sup> ----- 7 min	5 $\mu$ L PCR buffer 10X 2.5 mM Mgcl2 300 $\mu$ M dNTP (Fermentas) 0.4 $\mu$ M of each primers F & R 2 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 $\mu$ L DNA template

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

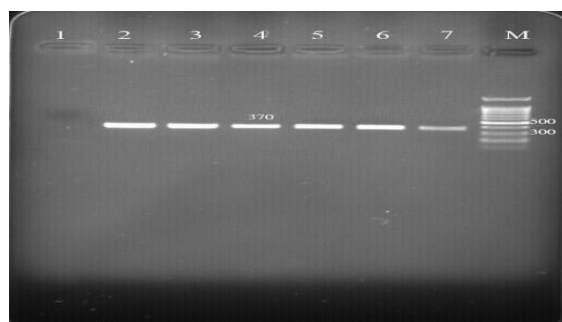
تعداد و درصد موارد مثبت	درصد گوشت	نوع همبرگر
۱۰ (۱۰۰٪)	٪۶۰	شماره ۱
۵ (۱۰۰٪)	٪۳۰	شماره ۲
۳ (۶۰٪)	٪۳۰	شماره ۳
۱	٪۳۰	شماره ۴

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

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

از ۳۳ ایزوله *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از همبرگر، ژن *efaA* در ۸ ایزوله (۲۴/۲۴ درصد)، ژن *cylA* در ۱۲ ایزوله (۳۶/۳۶ درصد)، ژن *gelE* در ۹ ایزوله (۲۷/۲۷ درصد)، ژن *agg* در ۲ ایزوله (۶/۰۶ درصد)، ژن‌های *cylB* و *cylM*، *ace*، *asa* و ژن‌های مذکور در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نگردید. نتایج فراوانی ژن‌ها به تفکیک نوع همبرگر در جدول (۴) نشان داده شده است.

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



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

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

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

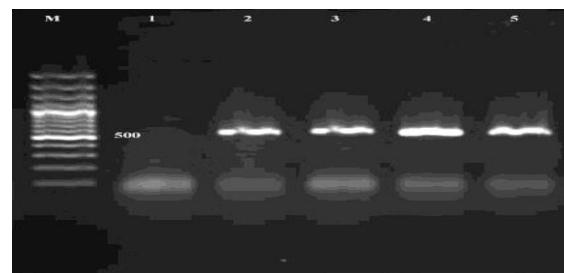
شکل (۴): الکتروفورز محصولات PCR ژن های *agg* و *esp* ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتناز، ستون ۱: کنترل منفی، ستون های ۲، ۳ و ۴: باندهای ۱۵۵۳ جفت بازی و ۹۳۳ جفت بازی مربوط به ژن های *agg* و *esp*

در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین نوع همبرگر و نوع ژن ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید ( $P\text{-Value} = 1/100 < 0$ )

#### بحث

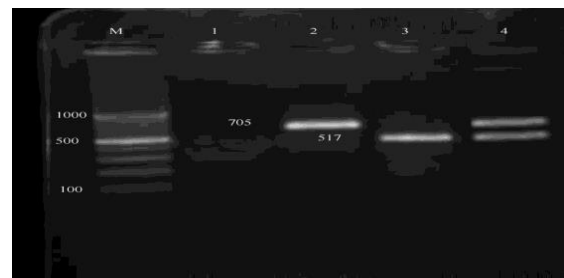
بیماری های عفونی که توسط غذا یا آشامیدنی ها انتشار می یابند، معمولا رنج آور و گاهی مسئله تهدید آمیز برای میلیون ها نفر در سراسر جهان هستند. مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان داده که میان بیماری های ناشی از غذا در انسان و مصرف غذاهای نیم پز تهیه شده از گوشت ارتباط تنگاتنگی وجود دارد. (Kristich et al. (2004). با توجه به مشکلات ناشی از جوامع صنعتی و پیامدهای شغلی حاصل از آن و علاقه مردم به استفاده از غذاهای آماده مصرف نظیر فرآورده های گوشتی (همبرگر، سوسیس و کالباس) در رفع کمبود مواد پروتئینی و با در نظر گرفتن این که این فرآورده های گوشتی ارزان تر و راحت تر از گوشت خالص می باشد میزان مصرف آن ها در کشور ما طی دهه گذشته چندین برابر شده است. نظر به استفاده روز افزون مردم از همبرگر و با توجه به استفاده از گوشت گرم در تهیه همبرگر و تبلیغ مصرف آن خطر احتمالی مسمومیت غذایی و امکان آلودگی این محصول به عمده ترین باکتری های مولد مسمومیت غذایی بالاست

در شکل های (۲)، (۳) و (۴) الکتروفورز محصول PCR ژن های مذکور نشان داده شده است.

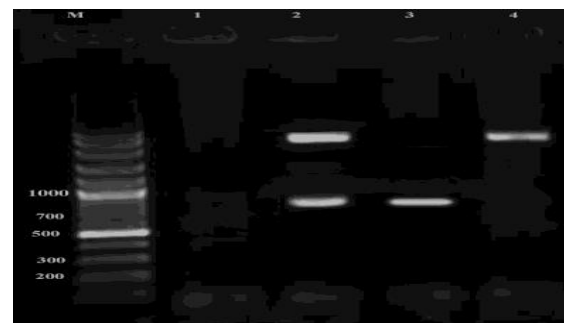


شکل (۲): الکتروفورز محصولات PCR ژن *gelE* (باند ۶۲۹ جفت بازی). ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتناز، ستون ۱ کنترل منفی، ستون های ۲-۵ نمونه های مثبت واجد ژن *gelE*

#### E



شکل (۳): الکتروفورز محصولات PCR ژن های *efaA* و *cyla* ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتناز، ستون ۱ کنترل منفی، ستون ۲: باند ۷۰۵ جفت بازی مربوط به ژن *efaA*، ستون ۳: باندهای ۵۱۷ و ۷۰۵ جفت بازی مربوط به ژن های *efaA* و *cyla*



فاسیوم بودند (Barbosa et al., 2010). 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. در مورد فراوانی فاکتورهای ویروالانس در ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس* تحقیقات متعددی صورت گرفته است. در تحقیق انجام شده توسط قاسمی و همکاران که به منظور بررسی فاکتورهای ویروالانس *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از نمونه‌های ادرار صورت گرفت، تولید بیوفیلم شدید و متوسط در ۱۶/۸٪، ژلاتیناز در ۲۰٪ و همولیزین در ۴۴/۲٪ از سویه‌ها گزارش گردید. (قاسمی و همکاران ۱۳۸۷).

بتینکورت و سوارتز<sup>۱۹</sup> در سال ۲۰۰۴ در مطالعه‌ای که بر روی ۹۵ ایزوله *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از موارد کلینیکی انجام دادند ۹ ژن *cylM cylB cyla aggA* و *gelE* و *enla efaA eep esp* را به وسیله PCR بررسی نمودند. آن‌ها بیان کردند که توزیع بسیار گسترده‌ای از ژن‌های حدت میان ایزوله‌های مورد بررسی وجود دارد. در ایزوله‌های مورد بررسی فراوانی ژن *efaA* (۵۸/۹٪)، *efaA* (۵۸/۹٪)، *eep* (۵۸/۹٪)، *esp* (۵۷/۹٪) بیان شد در حالی که مارکرهای دیگر حدت با درصد متغیری از ۹/۵ تا ۴۵٪ شناسایی شدند. حضور هم زمان فاکتورهای حدت مختلف در میان سویه‌های بالینی بدون در نظر گرفتن منابع آن‌ها مشاهده شد (Bittencourt et al., 2004). در مطالعه انجام شده توسط ایتون و گاسون<sup>۲۰</sup> در سال ۲۰۰۱ که به منظور بررسی عوامل حدت در نمونه‌های غذایی و ایزوله‌های بالینی *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* صورت گرفت، الگوهای متفاوت و متمایزی از بروز عوامل حدت در این سویه‌ها یافت شد. این محققان دریافتند در اغلب موارد فراوانی فاکتورهای ویروالانس در *انتروکوکوس* جدا شده از موارد کلینیکی نسبت به سویه‌های جدا شده از مواد غذایی بیشتر می‌باشد (Eton

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

بررسی و جداسازی *انتروکوکوس*ها به عنوان یکی از شاخص‌های بهداشتی در سایر مواد غذایی غیر از لبنیات نیز گزارش شده است. از آن جمله در طی تحقیقی توسط کولومان<sup>۱۷</sup> و همکاران در ترکیه با بررسی ۲۰۰ نمونه مختلف مواد غذایی شامل انواع گوشت گاو، ماهی و طیور، همبرگر، پیتزا، ناگت مرغ، استیک گاوی، سالاد و انواع ادویه‌ها در طی یک سال آلودگی ۵۰ درصدی به *انتروکوکوس*ها گزارش گردید (Koluman et al., 2009). به همین ترتیب باربوسا<sup>۱۸</sup> و همکاران در شمال پرتغال نیز جداسازی ۱۸۲ ایزوله *انتروکوکوس* از فرآورده‌های گوشتی تخمیری سنتی را گزارش نمودند که بیشترین ایزوله‌ها به ترتیب مربوط به *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس*

19 - Bittencourt and Suzart

20 - Eaton and Gasson

17 - Koluman

18 - Barbosa

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

در تحقیق انجام شده توسط باربوسا و همکاران که بر روی انتروکوک‌های جدا شده از گوشت‌های تخمیری سنتی در شمال پرتقال صورت گرفت، ۷۶ ایزوله انتروکوکوس فکالیس، ۴۴ ایزوله انتروکوکوس فاسیوم و ۶۲ ایزوله از انتروکوک‌های دیگر جداسازی گردید. در این تحقیق فراوانی ژن *efaA* ۱۰۰ درصد، فراوانی ژن *efaAfm* ۲/۶ درصد، فراوانی ژن *esp* ۳/۹ درصد، فراوانی ژن *agg* ۶۹/۷ درصد، فراوانی ژن *cylM* ۳/۹ درصد، فراوانی ژن *cylB* ۹ درصد، فراوانی ژن *cylA* ۳/۹ درصد و فراوانی ژن *gelE* ۶۷/۱ درصد گزارش گردید (Barbosa et al., 2010). از نظر فراوانی عوامل حدت در تحقیق ما با تحقیق مذکور تفاوت‌هایی ملاحظه می‌گردد به طوری که در تحقیق ما فراوانی ژن‌های *cylB* و *cylM* در هیچ ایزوله-ایی مشاهده نگردید ولی در تحقیق مذکور این ژن‌ها از فراوانی ۳/۹ درصد برخوردار بودند. سمدو<sup>۲۱</sup> و همکارانش در سال ۲۰۰۳ بیان کردند فرکانس ژن *cylA* در انتروکوکسی بسیار متغیر است و با نمونه‌های بالینی یا نمونه‌های جدا شده از مواد غذایی ارتباطی ندارد (Semdo et al., 2003).

در مطالعه‌ای که مدیروز<sup>۲۲</sup> و همکارانش در سال ۲۰۱۴ بر روی تشخیص مولکولی فاکتورهای ویروالانس انتروکوکوس فکالیس جدا شده از نمونه‌های مواد غذایی و بالینی داشتند بیان کردند که در سویه‌های بالینی، نسبت به ایزوله‌های مواد غذایی، شیوع ژن‌های ویروالانس *agg esp* ، *cylA* بیشتر بوده و ژن *esp* تنها در سویه‌های بالینی یافت شده است. در صورتی که در تحقیق ما ژن *esp* از فراوانی ۶ درصد برخوردار می‌باشد. به نظر می‌رسد که عدم

رعایت بهداشت فردی و انتقال باکتری از افراد دخیل در تهیه همبرگر به محصول علت این امر باشد. فعالیت ژلاتیناز و بتا همولیزین با حضور ژن‌های *gelE* و *cylA* ثابت شد. حضور بعضی از ژن‌های ویروالانس در سویه‌های کلینیکی به صورت ۱۰۰ درصد و در مواد غذایی به میزان کمتر گزارش شده است. نتایج حاصل از تجزیه تحلیل آماری نشان داد که ایزوله‌های جدا شده بالینی و غذایی دارای الگوهای متفاوتی از فاکتورهای ویروالانس می‌باشند (Modeiros et al., 2014).

### نتیجه گیری کلی

انتروکوک‌ها و کلی فرم‌ها به‌عنوان دو شاخص مهم بهداشتی مطرح هستند. با توجه به این‌که حضور زیاد انتروکوک‌ها در مواد غذایی می‌تواند دلیلی بر آلودگی مدفوعی باشد و با توجه به نقش بسیار مهم آن‌ها در مسمومیت‌های غذایی، نتایج حاصل از این تحقیق نشان دهنده آلودگی زیاد همبرگرهای عرضه شده در شهرستان شهرکرد می‌باشد و از آن‌جا که همبرگر از جمله محصولاتی است که به‌صورت دست ساز و به‌طور گسترده توسط اقشار مختلف مردم استفاده می‌شود، آلودگی بالای همبرگر می‌تواند باعث مسمومیت‌های غذایی در مصرف کنندگان گردد. خوشبختانه مطالعات مختلف حاکی از آن است که حضور ژن‌های ویروالانس در مواد غذایی به میزان کمتری از نمونه‌های کلینیکی می‌باشد که در تحقیق حاضر نیز چنین نتیجه‌ای حاصل شد.

### حمایت مالی

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

### تضاد منافع

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

21 - Smedo

22- Medeiros



7. Cosentino, S., Podda, G.S., Corda, A., Fadda, M.E., Deplano, M., Pisano, M.B. 2010. Molecular detection of virulence factors and antibiotic resistance pattern in clinical *Enterococcus faecalis* strains in Sardinia. *J Prev Med Hygiene*. 51: 31-36.
8. Coque, T., Patterson, T., Steckelberg, J., Murray, E. 1994. Incidence of hemolysin, gelatinase and aggregative substance among *enterococci* isolates from patients with endocarditic and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J Infect Dis*. 171: 1223-1229.
9. Eaton, T.J., and Gasson, M.J. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied Env Microbiol*. 67: 1628-1635.
10. Feglo, P., and Sakyi, K. 2012. Bacterial contamination of street vending food in Kumasi, Ghana. *J Med Biomed Sci*. 1: 1-8.
11. Fukushima, H. 1997. Introduction into Japan of pathogenic *Yersinia* through imported pork, beef and fowl. *Int J Food Microbiol*. 35: 205-212.
12. Hurlbert, R.E. 1998. *Microbiology Laboratory Manual*. 2nd ed. USA; Washington State University. 11-15.
13. Huycke, M.N., Sahn, D.F., Gilmore, M.S. 1998. Multiple- drug resistant *enterococci*: The nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis*. 4: 249-239.
14. Jett, B.D., Huycke, M.M., Gilmore, M.S. 1994. Virulence of *Enterococci*. *Clin Microbiol Rev*. ; 7: 462-478
15. Koluman, A., Akan, L.S., Çakiroğlu, F.P. 2009. Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. *Food Cont*. 20: 281-283.
16. Kristich, C.J, Li, Y.H., Cvitkovitch, D.G., Dunny, G.M. 2004. Esp independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*. 186: 154-163.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان از کارشناس محترم مرکز تحقیقات مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، جناب آقای مهندس مؤمنی تشکر و قدردانی می‌نمایند

## منابع

۱. رسولی پیروزیان، هانیه، حصاری، جواد، فرج نیا، صفرنیا، مقدم، محمد و قیاسی فر، شیوا. (۱۳۸۷). جداسازی و شناسایی سویه‌های انتروکوکوسی غالب در پنیر سنتی لیقوان. مقاله هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی.
۲. قاسمی، احمد، منیری، رضوان، خورشیدی، احمدو موسوی سید غلامعباس. (۱۳۸۷). بررسی فاکتورهای ویرولانسی انتروکوکوس فکالیسی جدا شده از نمونه‌های ادرار. مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران. شماره‌های ۲ و ۳. صفحه ۵۳-۵۸.
۳. میرحسینی، محبوبه. (۱۳۹۱). شناسایی انتروکوکوس تولید کننده باکتریوسین در محصولات لبنی به وسیله PCR، مجله زیست شناسی ایران. شماره ۳، صفحه ۳۵۷-۳۵۱.
4. Barbosa, J., Gibbs, P.A., Teixeira, P. 2010. Virulence factors among *enterococci* isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. *Food Cont*. 21: 651-656.
5. Bittencourt, M.E., and Suzart, S. 2004. Occurrence of virulence associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, *J Med Microbiol*. 53: 1069-1080.
6. Chow, J.W., Thal, A., Perri, M.B., Vazquez, J.A., Donabedian, S.M., Clewell, D.B., Zervos, M.J. 2003. Plasmid associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental *enterococcal* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*. 37: 2474-2477
17. Medeiros, A.W., Pereira, R.I., Oliveira, D.V., Martins, P.D., d'Azevedo, P.A., Van der Sand, J.S. 2014. Molecular detection of virulence factors among food and clinical

---

*Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. Braz J Microbiol. 145: 327–332

18. Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lodi, R. 2006. Technological and molecular characterization of *Enterococci* isolated from north-west Italian dairy products. Int Dairy J. 16: 875-867.

19. Ogier, J.C., Serror, P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. Int J Food Microbiol. 126: 301-291.

20. Semedo, T., Santos, M.A., Lopes, M.F., Figueiredo Marques, J.J., Barreto Crespo, M.T., Tenreiro R. 2003. Virulence factors in food, clinical and reference *Enterococci*: A

common trait in the genus? Systematic Applied Microbiol. 26: 13-22.

21. Seno, Y., Kariyama, R., Mitsuhata, R., Monden, K., Kumon, H. 2005. Clinical implications of biofilm Formation by *Enterococcus faecalis* in the uuirinary tract. Acta Med Okayama. 59: 79 -87.

22. Vergis, EN., Shankar, N., Chow, J.W., Hayden, M.K., Snyderman, D.R., Zervos, M.J. 2002. Association between the presence of *enterococcal* virulence factors gelatinase, hemolysin, and *enterococcal* surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. Clin Infect Dis. 35: 570-575.

## **Prevalence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* isolated from Hamburger**

**Mehdeyan R<sup>1</sup>, Tajbakhsh E<sup>2</sup>, Bamzadeh Z<sup>2</sup>**

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

\*Corresponding author: [ee\\_tajbakhsh@yahoo.com](mailto:ee_tajbakhsh@yahoo.com)

Received: December 19, 2020

Accepted: March 19, 2021

**Abstract**

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

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