Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Genomic polymorphism of *enterococcus faecalis* isolated from clinical cases using two methods of ERIC-PCR and BOX-PCR

Fatemeh Ahmadi[1], Elham Siasi[1]*, Kumarss Amini[2]

[1]Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
*Corresponding author; E-mail: emi_biotech2006@yahoo.com

Received: 12 December 2017 Accepted: 8 April 2018 First Published online: 18 November 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019;41(5):16-24

Abstract

Background: The genome of Enterococcus has a large number of repetitive sequences that are randomly distributed over DNA. In ERIC-PCR, a separate pattern is obtained for each strain and is considered a separate type. Prokaryotic and eukaryotic genomes include dispersed repeat sequences that are relatively short non-coding, and dispersed in the bacterial genome. BOX-PCR and ERIC-PCR primers are complementary to these repeat sequences and allow for dedicated binding and unique BOX-PCR fingerprint patterns and ERIC-PCR with reproducibility capability.

Methods: In this cross-sectional descriptive study, based on previous studies and 95% confidence level using the formula n = z2P (1-P)/d2 and acceptable error 0.05, total of 60 *Enterococcal Faecalis* strains were cultured from sterile specimens on KF agar medium and incubated at 37°C for 24h and were identified by biochemical tests of suspected *Enterococcal Faecalis*. DNA samples were extracted and BOX-PCR and ERIC-PCR tests were performed.

Results: All strains were distinguished in 25 distinct clusters at the level of similarity of 58%. Also, by analyzing the ERIC-PCR results, all strains were segregated into 15 separate clusters at a similar level of 58%.

Conclusion: Molecular fingerprinting with BOX-PCR has a better subtraction and differentiation than ERIC-PCR for typing bacterial isolates and is widely used in epidemiological studies and trace source of infection and taxonomy.

Keyword: *Enterococcus Faecalis*, BOX-PCR, ERIC-PCR, Polymorphism.

How to cite this article: Ahmadi F, Siasi E, Amini K. [Genomic polymorphism of enterococcus faecalis isolated from clinical cases using two methods of ERIC-PCR and BOX-PCR]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019;41(5):16-24. Persian.

© 2019 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

پلی‌مورفیسم ژنومی *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از موارد بالینی با استفاده از دو روش‌های ERIC-PCR و BOX-PCR

فاطمه احمدی[۱]، الهام سیاسی[۱*]، کیومرث امینی[۲]

[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
[۲] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.
[*] نویسنده مسئول؛ ایمیل: emi_biotech2006@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۶/۹/۲۱   پذیرش: ۱۳۹۷/۱/۱۹   انتشار برخط: ۱۳۹۸/۸/۲۷
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز. آذر و دی ۱۳۹۸؛ ۴۱(۵):۱۶-۲۴

چکیده

زمینه: ژنوم انتروکوکوس تعداد زیادی توالی تکراری دارد که به طور تصادفی در طول DNA پراکنده شده‌اند. در ERIC-PCR برای هر سویه یک الگوی مجزا به دست می‌آید و یک تایپ جداگانه در نظر گرفته می‌شود. ژنوم پروکاریوتی و یوکاریوتی شامل توالی‌های تکراری است که نسبتاً کوتاه و غیر کد دهنده هستند. آغازگرهای BOX-PCR و ERIC-PCR مکمل این توالی‌های تکراری هستند و اجازه می‌دهد تا اتصال اختصاصی انجام گردد و الگوهای منحصر به فرد اثر انگشتی BOX-PCR و ERIC-PCR با قابلیت تولید مجدد فراهم شود.

روش کار: در این مطالعه مقطعی-توصیفی، بر اساس مطالعات قبلی و سطح اطمینان ۹۵٪ با استفاده از فرمول n= z2P(1-P)/d2 و خطای قابل قبول ۰/۰۵، تعداد ۶۰ سویه *انتروکوک فکالیس* از نمونه‌های بالینی جمع‌آوری و در شرایط استریل بر روی محیط KF آگار کشت و مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری و به‌وسیله تست‌های بیوشیمیایی نمونه‌های *انتروکوک فکالیس* تعیین هویت شدند. DNA نمونه‌ها استخراج و آزمایش BOX-PCR و ERIC-PCR صورت گرفت.

یافته ها: نتایج آزمون BOX-PCR و آنالیز دندوگرام نشان داد که، تمامی سویه‌ها در سطح تشابه ۵۸ درصد به ۲۵ کلاستر مجزا قابل تمایز بودند. هم‌چنین نتایج آزمون ERIC-PCR نشان داد که تمامی سویه‌ها در سطح تشابه ۵۸ درصد به ۱۵ کلاستر مجزا تفکیک شدند.

نتیجه‌گیری: انگشت‌نگاری مولکولی توسط روش BOX-PCR دارای قدرت تفریق و تمایز بسیار مناسب‌تری نسبت به ERIC-PCR، جهت تایپینگ جدایه‌های باکتری‌ها می‌باشد و دارای کاربرد فراوان در مطالعات اپیدمیولوژی و ردیابی منبع عفونت و تاکسونومی هستند.

کلید واژه‌ها: *انتروکوک فکالیس*، BOX-PCR، ERIC-PCR، پلی‌مورفیسم

نحوه استناد به این مقاله: احمدی ف، سیاسی ا، امینی ک. پلی‌مورفیسم ژنومی انتروکوکوس فکالیس جدا شده از موارد بالینی با استفاده از دو روش‌های ERIC-PCR و BOX-PCR. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۵):۱۶-۲۴

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

انتروکوک‌ها کوکسی‌های گرم مثبت و ساکنان طبیعی دستگاه گوارش انسان و گروهی از حیوانات می‌باشند. این باکتری فلور نرمال روده محسوب می‌شود و وقتی به مکان دیگری غیر از محل زندگی خود وارد شوند می‌توانند مشکل آفرین شوند. ورود انتروکوک به خون، دستگاه ادراری و هر نقطه دیگر بدن مخصوصاً در افراد حساس می‌تواند سبب ایجاد عفونت گردد. مهم‌ترین عفونت‌های ایجاد شده توسط انتروکوک‌ها عبارتند از: عفونت‌های مجرای ادراری، باکتریمی، اندوکاردیت و مننژیت. سویه‌های حساس را می‌توان با استفاده از آمپی‌سیلین و وانکومایسین درمان کرد (۱). عفونت‌های انتروکوکی به‌صورت بالقوه می‌توانند موجب مقاومت‌های گسترده آنتی‌بیوتیکی گردند که سبب شکست در درمان آنتی‌بیوتیکی این عفونت‌ها می‌شوند. تشخیص دقیق انتروکوک‌ها در حد گونه به علت تفاوت آنها از نظر بیماری‌زایی و اپیدمیولوژی، حائز اهمیت است (۲, ۳). به علت مشکلات متعدد در درمان عفونت‌های انتروکوکی به دلیل مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی این باکتری باید جنس و گونه ایزوله‌های انتروکوکی را به درستی مشخص نمود. تشخیص گونه در انتروکوک‌ها بخصوص گونه‌هایی که به‌صورت ذاتی به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت دارند مانند مقاومت گونه فسیوم به بتالاکتام‌ها و یا مقاومت انتروکوک‌های دارای حرکت به ونکومایسین، تیکوپلانین، مقادیر بالای جنتامیسین و استرپتومایسین در درمان و بررسی اپیدمیولوژی بیماری‌ها بسیار حائز اهمیت است (۴). در طی دو دهه گذشته روش‌های جدید مولکولی بر پایه آنالیز DNA جایگزین و یا مکمل روش‌های رایج تایپینگ باکتری‌ها مثل فاژتایپینگ، باکتریوسین تایپینگ و سروتایپینگ شده‌اند (۵). در روش‌های تایپینگ کلاسیک مشکلاتی از جمله قابل انجام نبودن سیستم‌های فاژتایپینگ و باکتریوسین تایپینگ برای همه انواع باکتری‌ها و همچنین هزینه زیاد سروتایپینگ یا تردید در مورد صحت نتایج آنها مورد توجه قرار داشته است. از دیگر محدودیت‌های این روش‌ها تغییر مارکرهای فنوتیپی باکتری‌ها در شرایط مختلف را نیز می‌توان اشاره نمود. بنابراین اگر چه روش‌های کلاسیک هنوز جایگاه خود را در تایپینگ سویه‌ها دارند ولی بکارگیری یک روش دقیق برای تایپینگ ضروری می‌باشد (۶). به همین منظور روش‌های تایپینگ مولکولی بسیاری طراحی شده است، یکی از قابل قبول‌ترین آنها که ارتباط خویشاوندی بین سویه‌ها را در مقیاس وسیع نشان می‌دهد روش MLST و PFGE است (۷, ۸). که در تایپینگ مولکولی برای جامعه آماری کوچکتر مانند بررسی بیمارستانی کاربرد دارند. اما به دلیل هزینه بالا و وقت گیر بودن این تکنیک‌ها، روش‌های مولکولی دیگری نیز معرفی شده‌اند که در بسیاری از مطالعات مورد استفاده قرار می‌گیرند، از جمله روش‌های RAPD-PCR، Rep-PCR و ERIC-PCR (۹, ۱۰). Bedendo و Pignatari در برزیل در سال ۲۰۰۰ در تایپینگ مولکولی انتروکوک فکالیس بوسیله JB1) PCR و REP) و PFGE، نشان دادند که هر سه روش ژنوتایپ‌های یکسانی را نشان دادند اما هم‌خوانی و توافق یکسانی بین آن‌ها وجود ندارد (۱۱). Wijetunge و همکاران در سال ۲۰۱۲ در پنسیلوانیا در بررسی تحت عنوان انگشت‌نگاری (Fingerprinting) ایزوله‌های ماکیان انتروکوکوس سکوروم با استفاده از سه روش تایپینگ مولکولی (PFGE، RAPD-PCR و ERIC-PCR)، دریافتند که هر دو روش PFGE و ERIC-PCR دارای تنوع ژنتیکی بالایی در ایزوله‌های انتروکوک سکوروم هستند (۱۲). مدت زمان متوسط برای انجام روش‌های مبتنی بر PCR مانند ERIC-PCR در انتروکوک‌ها حدود ۲۴ ساعت است در حالی‌که تست‌های بیوشیمیایی یا غربالگری جهت یافتن سویه‌های مقاوم به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها حداقل ۹۶ ساعت وقت نیاز دارند (۱۳). ERIC-PCR به دلیل بررسی توالی مشخصی در ژنوم نسبت به سایر روش‌های مولکولی برتری دارد. هم‌چنین این روش در برخی مطالعات حتی با تکنیک‌هایی چون PFGE نیز مقایسه شده و یک روش در دسترس، ارزان، قابل تکرار و قابل قبول معرفی شده است (۱۴). در ژنوم انتروکوکوس تعداد زیادی توالی تکراری وجود دارد که به طور تصادفی در طول DNA پراکنده شده‌اند. در ERIC-PCR برای هر سویه یک الگوی مجزا به دست می‌آید و یک تایپ جداگانه در نظر گرفته می‌شود (۱۴). توالی‌های ERIC در واقع توالی‌های ۱۲۴-127bp هستند که واجد یک ناحیه معکوس تکرار شونده مرکزی حفاظت شده بوده که به شکل خارج ژنی در ژنوم باکتری‌های روده‌ای موجود بوده و پرایمرهای مورد استفاده در ERIC-PCR مکمل این توالی‌ها هستند و برای ژنوتایپینگ باکتری‌ها بکار می‌رود. عناصر BOX در طبیعت متشکل از بخش‌های کوچک‌تر هستند و مشتمل بر تحت توالی‌های محافظت شده متفاوت هستند و اولین عناصر تکرار شونده پراکنده یافت شده و شناخته شده در یک باکتری گرم مثبت (استرپتوکوکوس پنومونیه) هستند. سه نوع تحت‌واحد مختلف در عناصر BOX معین شده‌اند شامل BoxA (۵۷ جفت باز) و boxB (۴۳ جفت باز) و boxC (۵۰ جفت باز). الیگونوکلئوتیدهای کاوشگر (پروب) مکمل این تحت‌واحدها اثبات کرد که تنها توالی‌های مشابه تحت واحد boxA که به شدت محافظت شده است، در میان انواع باکتری‌ها وجود دارند. توالی‌های مشابه با boxB و boxC تنها در استرپتوکوک پنومونیه یافت شده‌اند. زیرواحد boxA با تعداد بسیار و بصورت پراکنده و منتشر در *استرپتوکوک پنومونیه* وجود دارد ولی در سایر باکتری‌های استرپتوکوکی نظیر *استرپتوکوکوس پیوژنز* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* مشاهده نشده است؛ با این وجود ارگانیسم‌های گرم منفی غیرخویشاوند نظیر *اشرشیاکولی* و سالمونلا دارای رونوشت‌های

متعدد از توالی‌های مشابه تحت‌واحد boxA است که در سرتاسر ژنوم آن‌ها پراکنده هستند (۱۵). Nayak و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه‌ای تحت عنوان مقایسه ارتباط ژنوتایپیک و فیلوژنیک ایزوله‌های انتروکوک بوسیله BOX-PCR برای هدف توالی ژن ۱۶S rRNA دریافتند که در ۷۷٪ از سویه‌ها دارای هم‌خوانی بود. این محققین دریافتند که BOX-PCR توانایی تمایز درون گونه‌ای (intraspecies) را دارد اما شناسایی غلط سویه‌ها در سطح گونه و تقسیم کردن در درون چندین گروه از معایب آن است (۱۶).

Jacksonو همکاران در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای تحت عنوان مقایسه BOX-PCR و PFGE برای شناسایی ارتباط ژنتیکی انتروکوکوس از محیط‌های مختلف نتیجه گرفتند که اگرچه انتروکوک جدا شده از منابع آبی با هر دو روش گروه‌بندی شدند، اما ایزوله‌های منشا گرفته از منابع آبی را نمی‌توان قطع به یقین به ماکیان ربط داد. این محققین نشان دادند که روش BOX-PCR توانایی ساب تایپ‌بندی و تکرارپذیری را دارد (۱۵). به منظور یافتن منبع انتشار عفونت‌ها، شناسایی گونه‌های دارای قدرت بیماری‌زایی بالا و نیز کنترل گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و کمک به سطح بهداشت جامعه، استفاده از روش‌های مختلف تایپینگ و یافتن رابطه خویشاوندی بین جدایه‌های باکتریال بسیار کمک کننده است. لذا در این پژوهش، با استفاده از روش انگشت‌نگاری مولکولی DNA موسوم به BOX-PCR و ERIC-PCR جهت تمایز و تفریق جدایه‌های *انتروکوک فکالیس* در نمونه‌های بالینی استفاده شده است.

روش‌کار

در این مطالعه مقطعی-توصیفی، بر اساس مطالعات قبلی و سطح اطمینان ۹۵٪ با استفاده از فرمول $n= z2P(1-P)/d2$ و خطای قابل قبول ۰/۰۵، تعداد ۶۰ سویه *انتروکوک فکالیس* جدا شده از افراد مبتلا به علایم عفونت ادراری در سنین مختلف ظرف مدت ۶ ماه در سال ۱۳۹۵ از مراکز درمانی تهران جمع‌آوری شد. به دلیل این‌که نمونه‌گیری به طور مستقیم از بیمار صورت نگرفت و همچنین نمونه‌ها مربوط به پلیت‌های میکروبی است و نام بیمار ذکر نگردید، به همین دلیل هیچ‌گونه دخالتی در روند تشخیص و درمان بیمار ایجاد نمی‌گردد. جهت انتقال نمونه‌ها از تیوپ‌های استریل جداگانه‌ای، جهت جلوگیری از اختلاط آلودگی مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های جمع‌آوری شده در شرایط استریل بر روی محیط بلادآگار و مک‌کانکی اگار (مرک، آلمان) در آزمایشگاه گروه پژوهشی پاسارگاد کشت و مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. و با آزمون‌های فنوتیپی و استاندارد میکروبی مانند تست اندول، متیل رد، سیترات، تولید هیدروژن سولفید در محیط TSI و تست اوره‌آز مورد ارزیابی قرار گرفتند. انتروکوکوس‌ها قادر به رشد در محیط حاوی ۶/۵ درصد نمک، دمای ۱۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد هستند. انتروکوکوس‌ها کاتالاز منفی و PYR مثبت هستند و بر روی محیط بایل‌اسکولین‌آگار کلنی‌های سیاه رنگ ایجاد می‌کنند. لذا از این تست‌های بیوشیمیایی برای تعیین هویت انتروکوکوس‌ها استفاده شد. DNA ژنومی باکتری توسط کیت مرکز ذخایر ژنتیک ایران و براساس پرتکل آن استخراج شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی۴ میکرولیتر DNA الگو (۲۰۰ نانوگرم)، ۲۰ پیکومول از پرایمر BOX (۲میکرولیتر)، ۴ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰ میکرولیتر مستر میکس Amplicon 2x انجام شد. شرایط دمایی PCR شامل مرحله دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و ۳۵ سیکل با مرحله دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در پایان قطعات تکثیر یافته با استفاده ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌برماید مشاهده گردید. رایمرهای به کار رفته در این پژوهش در جدول ۱ آمده است.

واکنش ERIC-PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی۴ میکرولیتر DNA الگو (۲۰۰ نانوگرم)، ۱۰ پیکومول از پرایمر ERIC-F (۱میکرولیتر)، ۱۰ پیکومول از پرایمر ERIC-R (۱میکرولیتر)، ۴ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس Amplicon 2x انجام شد. شرایط دمایی PCR شامل مرحله دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و ۳۵ سیکل با مرحله دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در پایان قطعات تکثیر یافته با استفاده ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌برماید مشاهده گردید. پرایمرهای به کار رفته در این پژوهش در جدول ۱ آمده است.

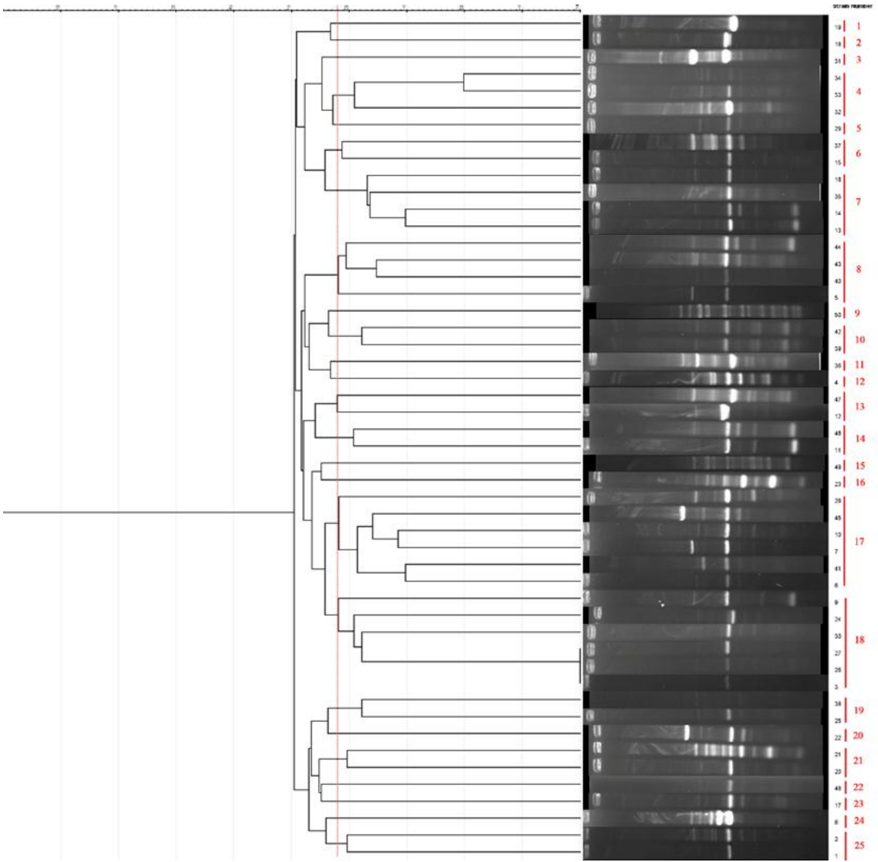
جدول۱: پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی تنوع ژنتیکی ایزوله‌های *انتروکوک فکالیس*

منبع	توالی (۳' به ۵')	نام پرایمر
(۱۷)	CTACGGCAAGGCGACGCT	BOXA1R
(۱۸)	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC	ERIC-1R
(۱۸)	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	ERIC2-F

نقوش انگشت‌نگاری ژنومی BOX-PCR و ERIC-PCR بر اساس وجود یا عدم وجود باند به صورت رمزهای صفر و یک نمره‌دهی شدند. و سپس با استفاده از نرم‌افزار NTsys درخت فیلوژنی ترسیم گردید. قابل ذکر است که برای تعیین تشابه سویه‌ها و ترسیم درخت فیلوژنی از ضریب تشابه جاکارد و روش میانگین‌های حسابی بی‌وزن (UPGMA) استفاده شد. قدرت تمایزی روش BOX-PCR و ERIC-PCR نیز توسط معادله Simpon's Index Diversity انجام گرفت.

جدول ۲: مشخصات ایزوله‌های *انتروکوک فکالیس* و گروه‌بندی آن‌ها

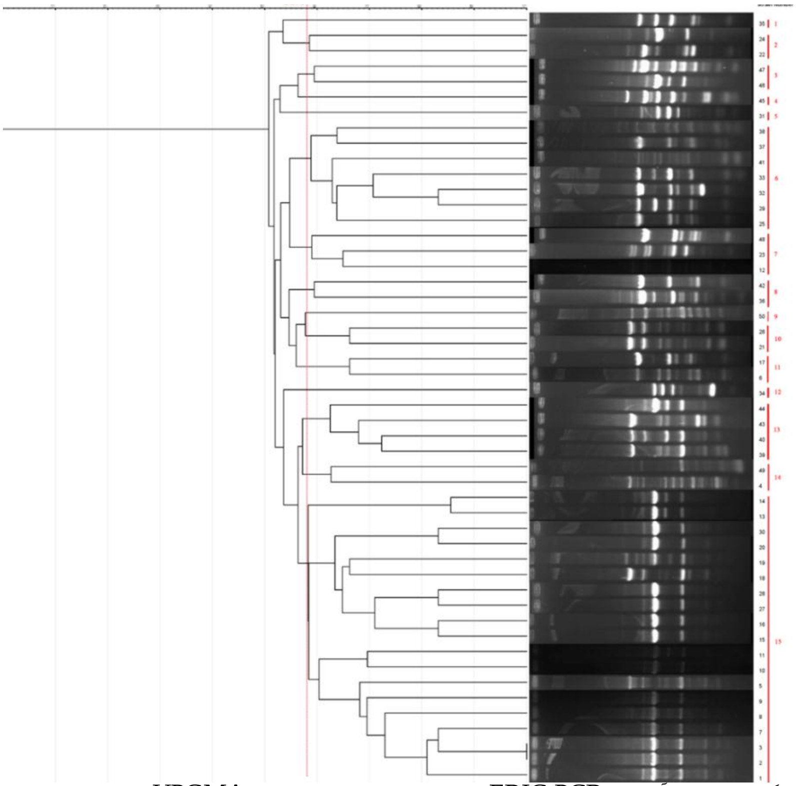
شماره سویه	گروه	شماره سویه	گروه	شماره سویه	گروه	شماره سویه	گروه	شماره سویه	گروه
۱	۲۵	۱۱	۱۴	۲۱	۲۱	۳۱	۳	۴۱	۱۷
۲	۲۵	۱۲	۱۳	۲۲	۲۰	۳۲	۴	۴۲	۱۰
۳	۱۸	۱۳	۷	۲۳	۱۶	۳۳	۴	۴۳	۸
۴	۱۲	۱۴	۷	۲۴	۱۸	۳۴	۴	۴۴	۸
۵	۸	۱۵	۶	۲۵	۱۹	۳۵	۷	۴۵	۱۷
۶	۱۷	۱۶	۷	۲۶	۱۸	۳۶	۱۱	۴۶	۱۴
۷	۱۷	۱۷	۲۳	۲۷	۱۸	۳۷	۶	۴۷	۱۳
۸	۲۴	۱۸	۲	۲۸	۱۷	۳۸	۱۹	۴۸	۲۲
۹	۱۸	۱۹	۱	۲۹	۵	۳۹	۱۰	۴۹	۱۵
۱۰	۱۷	۲۰	۲۱	۳۰	۱۸	۴۰	۸	۵۰	۹



شکل ۱: دندوگرام حاصل از آزمایش BOX-PCR با ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA و قدرت تمایز ۵۸ درصد.

یافته ها

نمونه‌برداری: از بیمارستان‌های آموزشی تهران نمونه ادرار جمع‌آوری شد. معیار تایید جدایه‌های انتروکوکوس، ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی این باکتری بود. پس از تشخیص، نمونه‌هایی که خصوصیات بیوشیمیایی آن‌ها با ویژگی‌های *انتروکوکوس فکالیس* منطبق بود به عنوان نمونه مثبت درج گردیدند و کلنی‌های مربوط ذخیره شدند. نتایج آزمون BOX-PCR و آنالیز شکل‌ها و دندوگرام حاصل، تمامی سویه‌ها در سطح تشابه ۵۸ درصد به ۲۵ کلاستر مجزا قابل تمایز بودند (شکل ۲).



شکل ۲: دندوگرام حاصل از آزمایش ERIC-PCR با ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA و قدرت تمایز ۵۸ درصد.

به‌طوری‌که در گروه اول، دوم، سوم، پنجم، نهم، یازدهم، دوازدهم، پانزدهم، شانزدهم، بیستم، بیست و دوم، بیست و سوم و بیست و چهارم هرکدام یک ایزوله، در گروه ششم، دهم، سیزدهم، چهاردهم، نوزدهم، بیست و یکم و بیست و پنجم هرکدام دو ایزوله، در گروه چهارم سه ایزوله، در گروه هفتم و هشتم، چهار ایزوله، در گروه هفدهم و هجدهم بیشترین ایزوله یعنی شش ایزوله قرار گرفتند (جدول ۲). با توجه به اطلاعات مندرج در جدول ۲ و تعداد تیپ‌های ژنتیکی بدست آمده، قدرت تمایزی روش BOX-PCR، ۰/۹۵ محاسبه شد. نتایج آزمون ERIC-PCR آنالیز شکل‌ها و دندوگرام حاصل، تمامی سویه‌ها در سطح تشابه ۵۸ درصد به ۱۵ کلاستر مجزا قابل تمایز بودند (شکل ۳). به‌طوری‌که در گروه اول، چهارم، پنجم، نهم و دوازدهم هرکدام یک ایزوله، در گروه دوم، سوم، هشتم، دهم، یازدهم و چهاردهم هرکدام دو ایزوله، در گروه ششم، هفت ایزوله، در هفتم، سه ایزوله، در گروه سیزدهم، چهار ایزوله و در گروه پانزدهم، نوزده ایزوله قرار گرفتند (جدول ۲).

بحث

انتروکوک‌ها، کوکسی‌های گرم مثبت کاتالاز منفی می‌باشند که به‌عنوان فلور طبیعی دستگاه گوارش تلقی می‌گردند. این باکتری‌ها در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی به خصوص عفونت‌های دستگاه ادراری به واسطه سوندگذاری، عفونت‌های داخل شکمی و عفونت‌های لگنی نقش اساسی دارند (۳). عفونت‌های انتروکوکی می‌تواند موجب مقاومت‌های گسترده آنتی‌بیوتیکی گردد. تشخیص دقیق انتروکوک‌ها در حد گونه به علت تفاوت آن‌ها از نظر بیماری‌زایی و اپیدمیولوژی، حائز اهمیت است (۲، ۳). به علت مشکلات متعدد در درمان عفونت‌های انتروکوکی به دلیل مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی این باکتری باید جنس و گونه ایزوله‌های انتروکوکی را به درستی مشخص نمود. تشخیص گونه در انتروکوک‌ها بخصوص گونه‌هایی که به‌صورت ذاتی به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت دارند مانند مقاومت گونه فسیوم به بتالاکتام‌ها، یا مقاومت انتروکوک‌های دارای حرکت به ونکومایسین، تیکوپلانین، مقادیر بالای جنتامیسین و استرپتومایسین در درمان و بررسی اپیدمیولوژی بیماری‌ها بسیار حائز اهمیت است (۴). بعضی از گونه‌های این میکروارگانیسم مانند *انتروکوکوس کاسلیفلاوس* و *انتروکوکوس گالیناروم* متحرک هستند. این گروه از باکتری‌ها بی‌هوازی اختیاری با نیازهای غذایی پیچیده هستند. انتروکوکوس‌ها متابولیسم تخمیری داشته و از طریق چرخه امبدن–مایرهوف و تخمیر گلوکز تولید اسیدلاکتیک می‌کنند. در نتیجه فرمانتاسیون گلوکز توسط این باکتری‌ها اسیدلاکتیک تولید می‌شود

(۱۹). با وجود قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک در جنس انتروکوک‌ها، تغییرات گسترده‌ای در بروز بیماری، ویرولانس و توزیع جغرافیایی وجود دارد. کسب یا از دست دادن برخی از ژنها و موتاسیون‌ها، نقش مهمی در تکامل تایپ‌های مختلف انتروکوک‌ها ایفا می‌کند. ردیابی و بررسی این تغییرات ژنتیکی در جامعه نقش بسیار مهم و حائز اهمیتی و اطلاعات زیادی در مورد اپیدمیولوژی و شناسایی منابع عفونت به منظور کنترل عفونت و نظارت اپیدمیولوژیک در اختیار قرار می‌دهد (۲۰). مواد ژنتیکی موجودات در طول زمان تغییر می‌یابند و یکی از علل اصلی آن نیز جهش و نوترکیبی است. بر اساس شواهد موجود، سرعت این تغییرات در بین موجودات مختلف یکسان نیست. البته سرعت ایجاد ژنهای جدید با سرعت پخش شدن آنها در جامعه یکسان نیست، زیرا بسیاری از ژنهای جهش یافته باعث مرگ موجود می‌شوند و امکان اشاعه آنها در جامعه وجود ندارد. اما نکته جالب و مهم آن است که سرعت متوسط ایجاد شکل‌های جدید یک ژن در سطح جامعه تقریبا ثابت و قابل محاسبه است و از آن به‌عنوان ساعت مولکولی (Molecular Clock) اسم برده می‌شود (۲۱). بر این اساس می‌توان عنوان کرد که هر ژن در هر موجود یک ساعت مولکولی نسبتا دقیق و منحصر به فرد دارد. تیپ‌بندی سویه‌های میکروبی جزء لاینفک بررسی‌های اپیدمیولوژیک بیماری‌های عفونی می‌باشد. López و همکاران در سال ۲۰۱۵ در بررسی تحت عنوان ویژگی‌های مولکولی ایزوله‌های آلوده‌کننده میکروبی از خون بند ناف برای پیوند با استفاده از توالی ۱۶rRNA S دریافتند که روش ERIC-PCR تنوع ژنتیکی گسترده‌ای را در میان برخی از جنس‌ها (*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *اشرشیاکلی*، *انتروکوک فکالیس*، *استافیلوکوکوس همولیتیکوس*، *کلبسیلا پنومونیه*، *انتروکوکوس دورانس*، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*، *انتروکوکوس هیره* و *روزموناس ژنوموآسپیشز*) نشان داد اگرچه آنها متعلق به یک جنس یا گونه بودند. این محققین دریافتند که منشا اصلی آلودگی میکروفلور واژن، دستگاه هاضمه و فلور پوست می‌باشد (۲۲). فرد صانی و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های سالمونلا با روش ERIC PCR و رسم دندروگرام با استفاده از نرم‌افزار کامپیوتر Gel Compar پرداختند. در این بررسی ۵ ژنوتایپ مختلف مشاهده گردید که ۴ Common Type (CT) شامل ۲۹ ایزوله و یک Single Type (ST) مشخص شد و اکثر ایزوله‌های بالینی و مواد غذایی (۷۶/۷٪) به کلون‌های غالب CT1 و CT2 تعلق داشتند. نتایج این مطالعه نشان داد چرخش باکتری‌های مقاوم در بین جمعیت‌های انسانی و حیوانی تهدیدی جدی برای سلامت انسان‌ها می‌باشد (۲۳). روش BOX-PCR در پژوهش‌های قبلی در سراسر دنیا از جمله ایران برای تایپینگ مولکولی ایزوله‌های باکتری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است، Van Belkum و همکاران (۲۰۰۱) به بررسی تغییرات ژنتیکی باکتری *استرپتوکوکوس پنومونیه* با روش BOX-PCR پرداختند. در این مطالعه معین شد که آغازگرهای boxA1R و boxA بیشترین موفقیت را برای تایپینگ مولکولی پنوموکک برخوردار بود (۲۴). هم‌چنین Michelim و همکاران در سال ۲۰۰۸ روش‌های مختلف تایپینگ مولکولی را برای باکتری *پروتئس میرابیلیس* انجام دادند و در نهایت به این نتیجه رسیدند که روش‌های RAPD، BOX-PCR و ERIC-PCR قادر خواهند بود که به خوبی بین سویه‌های مختلف *پروتئوس میرابیلیس* تفکیک ایجاد کنند (۲۵). Kowalczyk و همکاران در سال ۲۰۰۲ به منظور ژنوتایپینگ ۶۸ سویه پروتئوس از سه روش Rep-PCR، BOX-PCR و ERIC-PCR استفاده نمودند. نتیجه بدین صورت بود که بهترین نتیجه ژنوتایپینگ با روش BOX-PCR به دست آمد، بدین شکل که بیشترین تعداد باندها و وضوح را در روش BOX-PCR بدست آوردند (۲۶). که نتایج پژوهش حاضر نیز نشان دهنده قدرت بهتر روش BOX-PCR نسبت به روش ERIC-PCR بود. با توجه به مطالعات این پژوهشگران در مطالعه حاضر نیز از پرایمر BOXA1R استفاده گردید. Zothanpuia و همکاران در سال ۲۰۱۶ به بررسی تنوع ژنتیکی باکتری‌های جدا شده از دریاچه آب شیرین به همراه حساسیت آنتی‌بیوتیکی و وابستگی فیلوژنتیکی با روش BOX-PCR پرداختند. تجزیه و تحلیل توالی ژن 16srDNA نشان داد ۸ ایزوله به عنوان ایزوله پروتئوس شناسایی شد. اندازه باندهای مشاهده شده در محدوده بین > 100 bpتا3 kb بود. دندروگرام حاصل از تجزیه و تحلیل BOX-PCR متشکل از دو گروه اصلی Aو B بود. *استافیلوکوس اورئوس* در گروه A1 قرار گرفت (۲۷). هم‌چنین نتایج این پژوهش با توجه به اینکه ضریب سیمپون برای روش BOX-PCR نسبت به ERIC-PCR بزرگ‌تر بود، نشان دهنده قدرت تفکیک بالاتر روش BOX-PCR نسبت به روش ERIC-PCR است. روش BOX-PCR و ERIC-PCR روش مناسبی جهت تایپینگ مولکولی سویه‌های باکتریایی و تعیین کانون‌های شیوع عفونت می‌باشد که می‌توان از آن جهت مطالعات اپیدمیولوژیک و تعیین راهبردهای کنترل عفونت استفاده نمود. به طور کلی این شواهد نشان می‌دهد که سویه‌های *انتروکوک فکالیس* از نظر ژنوتایپینگ دارای تنوع قابل توجهی هستند که بایستی مورد توجه بیشتر قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر سویه‌های *انتروکوک فکالیس* دارای الگوهای BOX متفاوتی بودند که نشان دهنده تنوع ژنتیکی سویه‌های *انتروکوک فکالیس* می‌باشد و احتمالا این سویه‌ها منشاء متفاوتی داشته که در حال چرخش بین حیوانات و انسان است. بنابراین پیدایش سویه‌های جدید و شناسایی کلون‌های کم شیوع در مطالعات مولکولی–اپیدمیولوژی به لحاظ پیش‌بینی‌های روش‌های کنترل

بهداشتی به منظور محدود کردن آن‌ها از دیگر رویکردهای مفید این مطالعه است. یافته‌های این پژوهش نشان داد که BOX-PCR به شکل دقیق‌تر و بهتری توانایی دسته‌بندی ایزوله‌های *انتروکوک فکالیس* را دارد، چرا که تمامی ایزوله‌ها با این روش قابل تایپ‌بندی بودند و ضریب سیمپون برای روش BOX-PCR نسبت به روش ERIC-PCR به عدد یک نزدیک‌تر بود که نشان دهنده قدرت بالاتر روش BOX-PCR نسبت به ERIC-PCR است.

قدردانی

نویسندگان این مقاله از زحمات حوزه پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و موسسه پژوهشی پاسارگاد تشکر می‌نمایند.

ملاحظات اخلاقی

این تحقیق شامل ملاحظات اخلاقی نمی‌شود.

منابع مالی

منابع مالی ندارد.

منافع متقابل

نویسندگان اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارند.

مشارکت مؤلفان

ف، ا، س و همکاران طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشته‌اند، هم‌چنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده‌اند.

References

1. Franz C M, Holzapfel W H, Stiles M E. Enterococci at the crossroads of food safety. *International journal of food microbiology* 1999; **47**(1): 1-24**.** doi: 10.1016/S0168-1605(99)00007-0
2. Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *International journal of food microbiology* 2005; **105**(3): 281-295**.** doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008
3. Marothi YA, Agnihotri H, Dubey D. Enterococcal resistance-an overview. *Indian journal of medical microbiology* 2005; **23**(4): 214**.**
4. Moreno M F, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *International journal of food microbiology* 2006; **106**(1): 1-24**.** doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026
5. Martin B, Garriga M, Hugas M, Aymerich T. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 2005; **98**(5): 1177-1190. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02555.x
6. Weigel R M, Qiao B, Teferedegne B, Suh D K, Barber D A, Isaacson R E, et al. Comparison of pulsed field gel electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reaction as genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring transmission of Salmonella. *Veterinary microbiology* 2004; **100**(3): 205-217**.** doi: 10.1016/j.vetmic.2004.02.009
7. Larsen M V, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig R L, et al. Multilocus sequence typing of total genome sequenced bacteria. *Journal of clinical microbiology* 2012; **50**(4): 1355-1361. doi: 10.1128/JCM.06094-11
8. Fugett E B, Schoonmaker-Bopp D, Dumas N B, Corby J, Wiedmann M. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of temporally matched Listeria monocytogenes isolates from human clinical cases, foods, ruminant farms, and urban and natural environments reveals source-associated as well as widely distributed PFGE types. *Journal of clinical microbiology* 2007; **45**(3): 865-873**.** doi: 10.1128/JCM.01285-06
9. Gutiérrez D, Martín-Platero AM, Rodríguez A, Martínez-Bueno M, García P, Martínez B. Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR to assess genetic diversity. *FEMS microbiology letters* 2011; **322**(1): 90-97**.** doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02342.x
10. Higgins P G, Hujer A M, Hujer K M, Bonomo R A, Seifert H. Interlaboratory reproducibility of DiversiLab rep-PCR typing and clustering of Acinetobacter baumannii isolates. *Journal of medical microbiology* 2012; **61**(1): 137-141**.** doi: 10.1099/jmm.0.036046-0
11. Bedendo J, Pignatari ACC. Typing of Enterococcus faecium by polymerase chain reaction and pulsed field gel electrophoresis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2000; **33**(11): 1269-1274**.** doi: 10.1590/s0100-879x2000001100002
12. Wijetunge D S, Dunn P, Wallner-Pendleton E, Lintner V, Lu H, Kariyawasam S. Fingerprinting of poultry isolates of Enterococcus cecorum using three molecular typing methods. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 2012; **24**(6): 1166-1171**.** doi: 10.1177/1040638712463563
13. Hulton C, Higgins C, Sharp P. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of Escherichia coli, Salmonella typhimurium and other enterobacteria. *Molecular microbiology* 1991; **5**(4): 825-834**.** doi: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb00755.x
14. Nath G, Maurya P, Gulati A K. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of Salmonella Typhi strains isolated over a period of two decades. *Infection, genetics and evolution* 2010; **10**(4): 530-536**.** doi: 10.1016/j.meegid.2010.02.004

15. Jackson C R, Furtula V, Farrell E G, Barrett J B, Hiott L M, Chambers P. A comparison of BOX-PCR and pulsed-field gel electrophoresis to determine genetic relatedness of enterococci from different environments. *Microbial ecology* 2012; **64**(2): 378-387. doi: 10.1007/s00248-012-0027-9
16. Nayak B S, Badgley B, Harwood V J. Comparison of genotypic and phylogenetic relationships of environmental Enterococcus isolates by BOX-PCR typing and 16S rRNA gene sequencing. *Applied and environmental microbiology* 2011; **77**(14): 5050-5055. doi: 10.1128/aem.00130-11
17. Versalovic J, Schneider M, De Bruijn F, Lupski J R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology* 1994; **5**(1): 25-40.
18. Versalovic J, Koeuth T, Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerpriting of bacterial enomes. *Nucleic acids research* 1991; **19**(24): 6823-6831 doi: 10.1093/nar/19.24.6823
19. Byappanahalli M N, Nevers M B, Korajkic A, Staley Z R, Harwood V J. Enterococci in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2012; **76**(4): 685-706. doi: 10.1128/mmbr.00023-12
20. Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections a review for healthcare epidemiologists. *Infection Control & Hospital Epidemio*logy 1997; **18**(6): 426-439. doi: 10.2307/30141252
21. Khoury M J, Beaty T H, Cohen B H. Fundamentals of genetic epidemiology. *Monographs in Epidemiology and Biostatistics* 1993; **11**: 942.
22. Bello-López J M, Noguerón-Silva J, Castañeda-Sánchez J I, Rojo-Medina J. Molecular characterization of microbial contaminants isolated from Umbilical Cord Blood Units for transplant. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2015; **19**(6): 571-577. doi: 10.1016/j.bjid.2015.07.005
23. Fardsanei F, Nikkhahi F, Bakhshi B, Salehi T Z, Tamai I A, Dallal M S. Molecular characterization of Salmonella enterica serotype Enteritidis isolates from food and human samples by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profiling,(GTG) 5-PCR and ERIC-PCR. *New microbes and new infections* 2016; **14**: 24-30. doi: 10.1016/j.nmni.2016.07.016
24. Van Belkum A, Hermans PW. BOX PCR fingerprinting for molecular typing of Streptococcus pneumoniae. Antibiotic Resistance. *Methods and Protocols* 2001; **48**: 159-168. doi: 10.1385/1-59259-077-2:159
25. Michelim L, Muller G, Zacaria J, Delamare APL, Costa SOPd, Echeverrigaray S. Comparison of PCR-based molecular markers for the characterization of Proteus mirabilis clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2008; **12**(5): 423-429. doi: 10. 1590/s1413-86702008000500014
26. Kowalczyk M, Sidorczyk Z. Determination of genetic diversity of Proteus pinner strains using rep-PCR. Genes and Proteins Underlying Microbial Urinary Tract Virulence. *Springer* 2002; **21**: 315-320. doi: 10.1007/0-306-46840-9_42
27. Passari A K, Gupta V K, Singh B P. Detection of antibiotic-resistant bacteria endowed with antimicrobial activity from a freshwater lake and their phylogenetic affiliation. *Peer J* 2016; **4**: e2103. doi: 10.7717/peerj.2103