مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۲۵، فروردین ۱۴۰۵، ۶۲-۵۱

بررسی فراوانی ژن‌های nheA و cytK در باسیلوس سرئوس‌های جدا شده از ماهی قزل‌آلای تازه عرضه شده در مراکز پخش ماهی تهران: یک مطالعه آزمایشگاهی

الهام سیاسی[۱]، الهه دانشور[۲]، لعیا تکبیری[۳]

دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۸/۱۲ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۱۴۰۴/۱۰/۰۹ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۱۴۰۵/۰۱/۰۸ پذیرش مقاله: ۱۴۰۵/۰۱/۲۵۰۹

چکیده

زمینه و هدف: غذاهای دریایی ارزش غذایی بسیار بالایی دارند و می‌توانند بر سلامتی جامعه مؤثر باشند. *باسیلوس سرئوس* یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای مسمومیت‌های ناشی از غذاهای دریایی است. هدف از پژوهش حاضر تعیین فراوانی ژن‌های nheA و cytK در *باسیلوس سرئوس‌های* جدا شده از ماهی قزل‌آلا بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، ۳۰ نمونه ماهی قزل‌آلای تازه عرضه شده در مراکز پخش ماهی تهران در سال ۱۴۰۳، به صورت تصادفی جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه‌ها در محیط کشت BHI (Brain heart infusion) آگار کشت داده شدند. سپس کشت تک‌کلنی‌ها در محیط کشت اختصاصی MYP (Mannitol egg Yolk Polymyxin) آگار انجام شد و رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز و PCR برای ژن 16S rRNA به‌منظور جداسازی و شناسایی باکتری *باسیلوس سرئوس* انجام گردید. توالی‌یابی ژن 16S rRNA، BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) در سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) آنالیز فیلوژنتیکی این ژن توسط نرم‌افزار MEGA 6.0 انجام شد و ژن‌های بیماری‌زای (nheA و cytK) در باکتری های جداسازی شده، توسط PCR شناسایی گردید. داده‌ها با آزمون آماری t مستقل تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: از ۳۰ نمونه بررسی شده، ۲ نمونه (۶/۶۶ درصد) *باسیلوس سرئوس* جداسازی و شناسایی شد و ۱۰۰ درصد آن‌ها حامل ژن‌های بیماری‌زای nheA و cytK بودند.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد جلوگیری از آلودگی غذاهای دریایی به باکتری *باسیلوس سرئوس* ضروری می‌باشد، زیرا تمامی سویه‌های جداسازی شده دارای ژن‌های حدت بودند. مطالعات بیشتر در این زمینه پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: *باسیلوس سرئوس*، ژن‌های nheA و cytK، ماهی قزل‌آلا

ارجاع: سیاسی ا، دانشور ا، تکبیری ل. بررسی فراوانی ژن‌های nheA و cytK در باسیلوس سرئوس‌های جدا شده از ماهی قزل آلای تازه عرضه شده در مراکز پخش ماهی تهران: یک مطالعه آزمایشگاهی. سال ۱۴۰۵، دوره ۲۵، شماره ۱، صفحات: ۶۲-۵۱.

۱- (نویسنده مسئول) دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران، ایران
تلفن: ۰۹۱۲۴۰۵۶۷۴۶، پست الکترونیکی: emi_biotech2006@yahoo.ca
۲- کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران، ایران

مقدمه

غذاهای دریایی از نظر خاصیت و ارزش غذایی یکی از بهترین خوراکی‌ها در سراسر جهان محسوب می‌شوند. غذاهای دریایی ارزش غذایی بسیار بالایی دارند و می‌تواند اثرات مختلفی بر سلامتی بگذارند. گوشت آبزیان کم چرب و سرشار از اُمگا ۳ و دیگر املاح معدنی است. اما با وجود همه این موارد، بیماری‌های منتقل شده از غذا، گروه بزرگی از بیماری‌های جهان و یکی از مهم‌ترین مشکلات هر جامعه هستند. مصرف ماهی و میگوی آلوده می‌تواند باعث ایجاد بیماری‌های دستگاه گوارش در انسان شود. پخت نادرست این محصولات، باعث می‌شود عوامل بیماری‌زا یا سموم پایدار در برابر حرارت آن‌ها، حتی در صورت پخت کامل، بدون تغییر باقی بمانند که این موارد می‌توانند باعث ایجاد بیماری شوند (۱-۵).

باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*) یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای مسمومیت‌های ناشی از غذاهای دریایی است که قادر به ایجاد مسمومیت غذایی است. *باسیلوس سرئوس* باکتری گرم مثبت، هوازی اختیاری و از خانواده باسیلاسه است. این باکتری متحرک، از نظر واکنش همولیتیک مثبت، کاتالاز مثبت و مقاوم به پنی‌سیلین می‌باشد. دمای مناسب رشد این باکتری ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد است ولی در دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد و در دمای پایین‌تر از ۷ درجه سانتی‌گراد نیز قادر به رشد است (۹-۶). هم‌چنین، قادر به ایجاد سندرم مسمومیت غذایی است. سندرم اسهالی به واسطه همولیزین hemolysin BL (HBL)، انتروتوکسین غیرهمولیتیک none-hemolytic (Nhe) enterotoxin و سیتوتوکسین cytotoxin K (Cyt K) ایجاد می‌شود (۱۴-۱۰). توکسین غیر همولیتیک Nhe، سمی سیتوتوکسیک است. تقریباً تمام سویه‌های *باسیلوس سرئوس*، توکسین غیر همولیتیک Nhe را تولید می‌کنند. ژن بیماری‌زای *nheA* به‌عنوان ژن کد کننده انتروتوکسین غیرهمولیتیک A شناخته می‌شود. انتروتوکسین غیرهمولیتیک A ماهیت پروتئینی دارد و در غشاء باکتری *باسیلوس سرئوس* وجود دارد و حداقل از سه جزء تشکیل شده است که همه آن‌ها برای حداکثر فعالیت سیتوتوکسیک مورد نیاز می‌باشند. این سه جزء پروتئینی توسط ۳ ژن *nheA*، *nheB* و *nheC* کد می‌شوند (۱۹-۱۵).

سیتوتوکسین K در *باسیلوس سرئوس* به دلیل دارا بودن فعالیت همولیتیک و سیتوتوکسیک، یک فاکتور مهم برای شیوع مسمومیت غذایی است. سیتوتوکسین K، نکروتیک و همولتیک می‌باشد و برای سلول بسیار سمی است. این سیتوتوکسین در سلول‌های اپی‌تلیال روده‌ای سمی بوده و هم‌چنین با توانایی تشکیل منافذ در لیپید دولایه غشاءهای این سلول ها، فعالیت انتروتوکسیکی دارد. هم‌چنین، باعث سوراخ شدن لیپید دو لایه و تخریب سلول‌های اپی‌تلیال بعد از ایجاد سوراخ و رها شدن مواد سیال داخل سلول، می شود و مکانیسم عمل آن در ایجاد اسهال از طریق ایجاد سوراخ در غشاء سلول‌های اپی‌تلیال می‌باشد و تقریبا در ۸۵ درصد از سویه‌های *باسیلوس سرئوس* یافت شده است (۲۲-۲۰).

علاوه بر نقش توکسیک غیر همولیتیک Nhe و سیتوتوکسین K در بیماری‌زایی *باسیلوس سرئوس*، به‌دلیل پتانسیل این عوامل بیماریزا به‌عنوان یک ابزار تشخیصی، برای شناسایی آلودگی محصولات غذایی با باکتری *باسیلوس سرئوس* مورد اهمیت هستند. مطالعات نشان داده است روش‌های مولکولی که حضور ژن‌های Nhe و CytK را در نمونه‌های غذا تشخیص می‌دهد، می‌تواند برای تشخیص سریع و حساس محصولات آلوده استفاده شود. به طور کلی، کشف و شناسایی این دو ژن منجر به درک بیشتر عوامل بیماری‌زای *باسیلوس سرئوس* شده و بینش‌هایی را

CCBY-NC.4.0 DEED

در مورد اهدافی برای تشخیص، پیشگیری و درمان عفونت *باسیلوس سرئوس* در انسان ارائه کرده است (۲۲-۱۸).

بنابراین، هدف از این تحقیق تعیین فراوانی ژن‌های *nheA* و *cytK*در *باسیلوس سرئوس*‌های جدا شده از ماهی قزل‌آلای تازه عرضه شده در مراکز پخش ماهی تهران به‌صورت آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه آزمایشگاهی در بازه زمانی تابستان ۱۴۰۳ تا زمستان ۱۴۰۳، با بررسی ۳۰ نمونه ماهی قزل‌آلای تازه که از مراکز میوه و تره‌بار شهر تهران تهیه گردید، انجام شد. ابتدا سوآپ استریل روی بدن هر ماهی کشیده شد و سوآپ داخل لوله آزمایش حاوی ۵-۳ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل قرار داده شد. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و پس از آن، تمامی مراحل پژوهش در زیر هود لامینار و در شرایط استریل انجام شد. این پژوهش، با مجوز کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال با شماره مجوز IR.IAU.TNB.REC.1403.135 انجام گرفته است.

به‌منظور غنی‌سازی و گرفتن تک کلنی از باکتری‌ها، از محیط کشت BHI آگار (Brain Heart Infusion Agar) و برای جداسازی باکتری *باسیلوس سرئوس*، از محیط کشت اختصاصی MYP آگار (Mannitol egg Yolk Polymyxin Agar)، رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز و شناسایی مولکولی توسط تکنیک PCR (Polymerase chain reaction) برای بررسی ژن 16sRNA اختصاصی این باکتری، استفاده شد (۲۳).

باکتری‌ها ابتدا غنی‌سازی شدند و سپس DNA آن‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (شرکت Zhinogene، کشور کره) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. برای اطمینان از حضور ژنوم و صحت استخراج، نمونه‌های DNA استخراج شده توسط الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱ درصد درون بافر TBE (Tris-Borate-EDTA) الکتروفورز شدند. هم‌چنین، با استفاده از دستگاه نانودراپ (مدل Thermo-2000، کشور آمریکا) نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برای ژنوم استخراج شده بین ۱/۸ تا ۲ محاسبه گردید (۲۴).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای شناسایی باکتری جدا شده با استفاده از مواد واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر (جدول ۱)، با دستگاه ترموسایکلر (مدل Jena Bioscience، کشور آلمان) با برنامه دمایی و زمانی نشان داده شده در جدول ۲، انجام گرفت. پرایمرها توسط نرم‌افزار Gene Runner 6.5.52 طراحی و توسط شرکت Macrogen کره جنوبی تهیه گردید (جدول ۳).

جدول ۱- مقادیر مواد مورد استفاده در واکنش PCR به منظور شناسایی باکتری باسیلوس سرئوس در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر

مواد	غلظت	مقدار (برحسب میکرولیتر)
Master mix (2X)	2X	۱۰
DNA (120ng)	120 ng	۱
پرایمر چپ (10 pmol/µl)	10 pmol/µl	۱
پرایمر راست (10 pmol/µl)	10 pmol/µl	۱
H_2O	-	۷
مواد موجود در Master mix	**غلظت**	**مقدار (برحسب میکرولیتر)**
Taq polymerase (50 U)	50 U	۱
dNTP (10 mm)	10 mm	۲
Buffer (10X)	10X	۵
$MgCl_2$ (50 mm)	50 mm	۲

CCBY-NC.4.0 DEED

جدول ۲- برنامه دمایی-زمانی PCR به منظور شناسایی باکتری باسیلوس سرئوس

شماره مرحله		نام مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان
۱		واسرشته شدن اولیه	۹۵	۳ دقیقه
۲	۳۵ چرخه	واسرشته شدن	۹۵	۲۰ ثانیه
۳		اتصال پرایمرها	۵۲	۲۰ ثانیه
۴		طویل شدن	۷۲	۲۰ ثانیه
۵		طویل شدن نهایی	۷۲	۳ دقیقه

جدول ۳- پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش به منظور شناسایی باکتری باسیلوس سرئوس

منبع	Tm (C°)	توالی نوکلئوتیدی		نام ژن
طراحی شده در	52	5'-AGAGTTTCCTGGCTCAG-3'	پرایمر چپ	*16S rRNA*
این تحقیق	52	5'-ACGGCTACCTTGTTACGATT-3'	پرایمر راست	

پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز انجام شد و سپس با دستگاه ژل داک عکس برداری انجام گرفت. محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال گردید. آنالیز فیلوژنتیکی ژن *16S rRNA* توسط نرم‌افزار MEGA نسخه ۶/۰ با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی براساس مدل های ۲ پارامتری Kimura انجام شد (۲۵، ۲۳).

به‌منظور شناسایی ژن‌های *nheA* و *cytK* در باکتری *باسیلوس سرئوس* جداسازی شده، از تکنیک PCR استفاده شد. مواد مورد استفاده و توالی پرایمرها و برنامه دستگاه PCR به ترتیب در جداول ۴، ۵ و ۶ آورده شده است. پرایمرها با نرم‌افزار Gene Runner 6.5.52 طراحی شد و توسط شرکت Macrogen کره جنوبی تهیه گردید (۲۶).

جدول ٤- مقادیر مواد مورد استفاده در واکنش PCR به منظور شناسایی ژن‌های nheA و cytK در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر

مقدار (برحسب میکرولیتر)	غلظت	مواد
۱۰	2X	Master mix (2X)
۱	120 ng	DNA (120ng)
۱	10 pmol/µl	پرایمر چپ (10 pmol/µl)
۱	10 pmol/µl	پرایمر راست (10 pmol/µl)
۷	-	H_2O

جدول ۵- پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش به منظور شناسایی ژن‌های nheA و cytK

منبع	طول توالی محصول bp	Tm C°	توالی نوکلئوتیدی		نام ژن
طراحی شده در این تحقیق	۷۵۱	۵۹	5'-AGGAGGGGCAAACAGAAGTG-3'	پرایمر چپ	*nheA*
		۵۹	5'-CGAAGAGCTGCTTCTCTCGT-3'	پرایمر راست	
طراحی شده در این تحقیق	۴۷۸	۵۹	5'-GGCGCTAGTGCAACATTACG-3'	پرایمر چپ	*cytK*
		۵۹	5'-TACCCGGAGAGAAACCGCTA-3'	پرایمر راست	

CCBY-NC.4.0 DEED

جدول ٦- برنامه دمایی-زمانی PCR به منظور شناسایی ژن‌های nheA و cytK

شماره مرحله		نام مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان
۱		واسرشته شدن اولیه	۹۵	۳ دقیقه
۲	۳۵ چرخه	واسرشته شدن	۹۵	۲۰ ثانیه
۳		اتصال پرایمر	۵۹	۲۰ ثانیه
۴		طویل شدن	۷۲	۲ دقیقه
۵		طویل شدن نهایی	۷۲	۳ دقیقه

پس از انجام واکنش PCR برای دو ژن *nheA* و *cytK* محصولات واکنش روی ژل آگارز الکتروفورز شدند و سپس با دستگاه ژل داک عکس‌برداری انجام گرفت.

نتایج

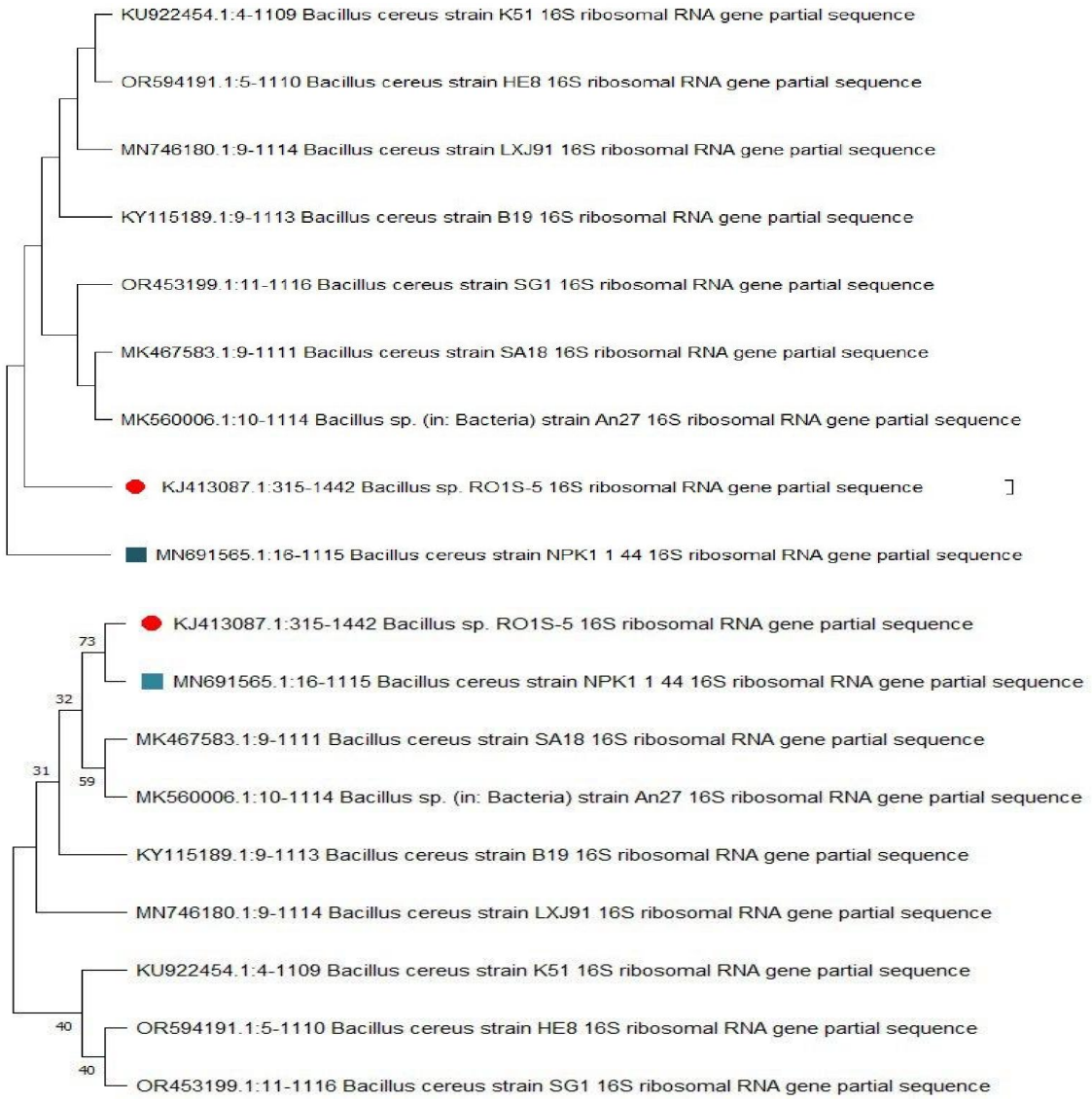
برای شناسایی بیوشیمیایی باکتری پس از رنگ‌آمیزی گرم، سلول‌های باسیلی گرم مثبت در زنجیره‌های کوتاه نشان‌گر باکتری *باسیلوس سرئوس* بود. جداسازی باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* توسط کشت تک کلنی‌ها و بالا آمدن کلنی‌های صورتی رنگ روی محیط کشت MYP آگار مشخص شد. با انجام تست کاتالاز تشکیل حباب بیان‌گر مثبت بودن این تست در باکتری‌های جدا شده و وجود آنزیم کاتالاز در آن‌ها بود.

برای شناسایی مولکولی باکتری، آزمون PCR روی نمونه‌های جدا شده انجام گردید و پس از الکتروفورز محصول PCR، در دو نمونه (۶/۶۶ درصد) باند اختصاصی ژن *16S rRNA* مربوط به باکتری *باسیلوس سرئوس* مشاهده شد. پس از انجام PCR برای ژن *16S rRNA*، توسط شرکت Macrogen کره جنوبی توالی یابی انجام شد و پس از آن BLAST در سایت NCBI انجام گرفت که نتایج نشان‌دهنده تأیید حضور باکتری *باسیلوس سرئوس* بود. درخت فیلوژنتیکی توسط نرم‌افزار MEGA 6.0 ترسیم و تفسیر گردید (جدول ۷ و شکل ۱).

جدول ۷- تفسیر درخت فیلوژنتیکی

نوع نمونه	شماره دست‌یابی	نمونه شناسایی شده
Sample 1	KJ413087.1	Bacillus sp. RO1S-5
Sample 2	MN691565.1	*Bacillus cereus* strain NPK1_1_44
SA18	MK467583	*Bacillus cereus* strain SA18
B19	KY115189	*Bacillus cereus* strain B19
LXJ91	MN746180	*Bacillus cereus* strain LXJ91
An27	MK560006	Bacillus sp. (in: firmicutes) strain An27
K51	KU922454	*Bacillus cereus* strain K51
HE8	OR594191	*Bacillus cereus* strain HE8
SG1	OR453199.1	*Bacillus cereus* strain SG1

CCBY-NC.4.0 DEED

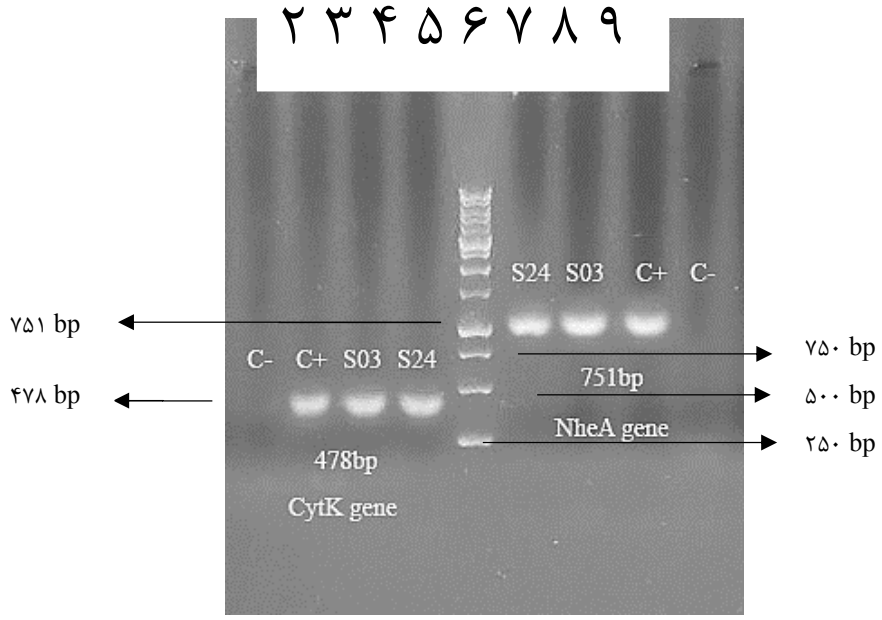


شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی

دایره قرمز (KJ413087.1) نشانگر sample 1 و مربع آبی (MN691565.1) نشان‌گر sample 2 برای نمایش توالی ژن 16s rRNA در نمونه‌های *Bacillus cereus* جداسازی شده در پژوهش حاضر هستند.

برای شناسایی ژن‌های *nheA* و *cytK*، پس از انجام آزمون PCR روی نمونه‌های جدا شده، الکتروفورز محصول PCR روی ژل اگاروز انجام شد و مشخص شد که هر ۲ نمونه *باسیلوس سرئوس* حامل ژن‌های nheA و cytK بودند و حضور ۱۰۰ درصد ژن‌ها در باکتری های جدا شده گزارش شد (شکل ۲).

CCBY-NC.4.0 DEED



شکل ۲- نتایج محصول PCR برای دو ژن nheA و cytK

خانه شماره ۵: مارکر مولکولی Kbp ۱۰، خانه شماره ۱ و ۹: نمونه کنترل منفی، خانه شماره ۲ و ۸: نمونه کنترل مثبت، خانه شماره ۳ و ۴: نمونه دارای ژن *cytK* با طول bp ۴۷۸ کمی پایین تر از باند bp ۵۰۰، خانه شماره ۶ و ۷: نمونه دارای ژن *nheA* با طول bp ۷۵۱ کمی بالاتر از باند bp ۷۵۰.

بحث

غذاهای دریایی ارزش غذایی بسیار بالایی دارند و می‌توانند تأثیرات مختلفی بر سلامتی بگذارند. پاتوژن‌هایی که به عنوان بیماری‌زاهای ناشی از محصولات دریایی گزارش شده‌اند، میکروارگانیسم‌های معمول در محل زندگی آبزیان نبوده و در هنگام فرآیندسازی یا تماس‌های بعدی و به صورت ثانویه وارد محصول غذائی دریایی می‌گردند (۵-۱). هدف از پژوهش حاضر تعیین فراوانی ژن‌های *nheA* و *cytK* در *باسیلوس سرئوس*‌های جدا شده از ماهی قزل‌آلای تازه عرضه شده در مراکز پخش ماهی تهران بود که نتایج آن نشان داد، ۶/۶۶ درصد نمونه‌ها آلوده به *باسیلوس سرئوس* بودند و ۱۰۰ درصد باکتری‌های جدا شده، حامل ژن‌های بیماری‌زای *nheA* و *cytK* بودند.

Rasool و همکاران، مطالعه‌ای در مورد جداسازی و شناسایی *باسیلوس سرئوس* از ماهی در هند را انجام دادند. در آن مطالعه ۱۴۰ نمونه از مناطق مختلف جامو در هند جمع‌آوری شد. از ۱۴۰ نمونه، ۳۹ ایزوله (۸۵/۲۷ درصد) از ویژگی‌های بیوشیمیایی *باسیلوس سرئوس* برخوردار بودند (۱). در مطالعه حاضر نیز از بین ۳۰ نمونه ماهی قزل‌آلای تازه جمع‌آوری شده از مراکز میوه و تره‌بار شهر تهران، ۲ نمونه (۶/۶۶ درصد) آلوده به باکتری *باسیلوس سرئوس* بودند که مشابه تحقیق Rasool فراوانی بالایی از آلودگی با باکتری *باسیلوس سرئوس* گزارش شد.

Amor و همکاران، پتانسیل سمیت و حساسیت ضدمیکروبی باکتری *باسیلوس سرئوس* جدا شده از مواد غذایی تونس را بررسی کردند. هدف از این مطالعه ارزیابی خطرات ۱۷۴ ایزوله *باسیلوس سرئوس* جدا شده از مواد غذایی مختلف با شناسایی ژن‌های بیماری‌زا (*cytK ،nheC ،nheB ،nheA ،hblD ،hblC ،hblB ،hblA*،

CCBY-NC.4.0 DEED

bceT و *ces*) بود. فراوانی ژن‌های انتروتوکسین شناسایی شده در بین ایزوله‌های *باسیلوس سرئوس*، *nheA* (۹۸/۹ درصد)، *nheC* (۹۷/۷ درصد) و *nheB* (۸۶/۸ درصد) در مقابل *hblC* (۵۴/۶ درصد)، *hblD* (۵۴/۶ درصد) و *hblA* (۲۹/۹ درصد) بود. سویه‌های مثبت برای *cytK* (۳۷/۹ درصد) نوع *cytK-2* را داشتند (۱۰). در پژوهش حاضر نیز شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی *باسیلوس سرئوس* در ماهی انجام گرفته است که ۶/۶۶ درصد ماهی‌ها به *باسیلوس سرئوس* آلوده بودند و ۱۰۰ درصد ماهی‌های آلوده، حامل ژن‌های *nheA* و *cytK* بودند.

Zhang و همکاران، شیوع و ویژگی بیماری‌زایی *باسیلوس سرئوس* جدا شده از محصولات آبزی در چین را مطالعه کردند. در مجموع ۸۶۰ نمونه آبزی جمع‌آوری شد. از بین همه نمونه‌ها، ۲۱۹ مورد (۲۵/۴۷ درصد) برای *باسیلوس سرئوس* مثبت بودند. ایزوله‌های مختلف پتانسیل بیماری‌زایی داشتند که در آن ۵۹/۶ درصد حاوی هر سه نوع ژن انتروتوکسین (*nhe*، *hbl* و *cytK-2*) و ۵/۱ درصد ژن *cesB* کدکننده سرئولید بودند (۴). در پژوهش حاضر نیز شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی *باسیلوس سرئوس* در ماهی انجام گرفت که بر اساس نتایج، ۶/۶۶ درصد ماهی‌ها به *باسیلوس سرئوس* آلوده بودند و ۱۰۰ درصد ماهی‌های آلوده حامل ژن‌های *nheA* و *cytK* بودند. نتایج این دو پژوهش از نظر فراوانی حضور ژن‌های حدت در باکتری آلوده کننده مواد غذایی دریایی با یکدیگر تفاوت داشتند که بیش‌تر بودن میزان ژن‌های حدت در مطالعه حاضر می‌تواند لزوم کنترل بهداشت و سلامت در مواد غذایی دریایی در مراکز کشور را مطرح نماید.

Zheng و همکاران در چین، شیوع و خصوصیات ژنومی آلودگی سویه‌های گروه *باسیلوس سرئوس* در محصولات غذایی را ارزیابی کردند. در مجموع ۸۹۱ سویه از باکتری‌های گروه *باسیلوس سرئوس* از ۱۱۸۱ نمونه غذا (۷۵/۳۵ درصد) از سال ۲۰۲۰ تا ۲۰۲۳ با استفاده از روش تشخیص استاندارد شناسایی شدند و مشخص شد که این سویه‌ها در انواع مختلف مواد غذایی شایع هستند. در مجموع ۲۳۴ سویه از ۸۹۱ سویه گروه *باسیلوس سرئوس* به‌طور تصادفی برای آنالیز تعیین توالی کل ژنوم (whole genome sequencing; WGS) انتخاب شدند. شناسایی گونه توسط تجزیه و تحلیل WGS حضور ۱۰ گونه مجزا در گروه *باسیلوس* را نشان داد که گونه *باسیلوس سرئوس* شایع‌ترین آن‌ها بود. ژن‌های اسهالی *nheABC*، *hblACD* و *cytK* در سویه‌های متعددی یافت شدند (۱۴). نتایج پژوهش حاضر از نظر فراوانی نمونه‌های آلوده به *باسیلوس سرئوس* با پژوهش Zheng مشابه گزارش شده است و از نظر فراوانی ژن‌های *nheA* و *cytK* در باکتری جدا شده، مشابه با تحقیق Zheng ، حضور ۱۰۰ درصد این ژن‌های بیماری‌زا مشاهده شد.

Sornchuer و همکاران در تایلند، توالی‌یابی کل ژنوم ژن‌های ایزوله‌های گروه *باسیلوس سرئوس* بیماری‌زا و غیربیماری‌زا را از مواد غذایی ارزیابی کردند. از نظر ژنتیکی ۲۴ ایزوله گروه *باسیلوس سرئوس* از مواد غذایی شناسایی شد. توالی‌یابی کل ژنوم (WGS) نشان داد که بیشتر ایزوله‌ها *باسیلوس سرئوس* (۱۲ ایزوله) بودند. ژن‌های شناسایی شده ژن‌های بیوسنتز باسیل‌باکتین (*dhbA*, *dhbB*, *dhbC*, *dhbE*, *dhbF*)، ژن‌های کدکننده انتروتوکسین غیرهمولیتیک (*nheA*, *nheB*, *nheC*)، ژن کدکننده پروتئین سطحی غنی از لوسین (ilsA) تنظیم شده با آهن و یک ژن کدکننده متالوپروتئاز (inhA) بودند. هم‌چنین، نشان داده شد که تجزیه و تحلیل مولکولی ابزار مفیدی برای شناسایی سریع سویه‌های گروه *باسیلوس سرئوس* و حضور ژن‌های بیماری‌زای مختلف در این باکتری می‌باشد (۱۵). در پژوهش حاضر نیز در باکتری *باسیلوس سرئوس* جدا شده از ماهی، شیوع بالای ژن های *nheA* و *cytK* نشان داده شد که از این نظر نتایج پژوهش حاضر

CCBY-NC.4.0 DEED

مشابه پژوهش Sornchuer، فراوانی بالای ژن‌های حدت را از نمونه های آلوده با *باسیلوس سرئوس* نشان داد.

از بررسی نتایج تحقیق حاضر با سایر مطالعات مشابه می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که آلودگی مواد غذایی مختلف به خصوص مواد غذایی دریایی با باکتری *باسیلوس سرئوس* می‌تواند خطری تهدید کننده برای سلامتی افراد جامعه باشد، زیرا در اکثر موارد شیوع بالای ژن‌های بیماری‌زا و ایجاد کننده مسمومیت غذایی در باکتری‌های ایزوله شده گزارش شده است. از این جهت لزوم کنترل و نظارت بیش‌تر بر بهداشت و تهیه و توزیع مواد غذایی برای پیشگیری و جلوگیری از ایجاد عفونت‌های گوارشی ناشی از مصرف این محصولات پیشنهاد می شود.

مطالعه حاضر با محدودیت‌هایی همراه بود. از مهم‌ترین آن موارد محدود نمونه‌های مورد استفاده بود که توصیه می‌شود در مطالعات آتی برای تأیید نتایج حاضر با حجم نمونه بیشتر و با فراوانی بالا از تنوع مواد غذایی دریایی بررسی انجام پذیرد. از محدودیت دیگر می‌توان به استفاده از روش آزمایشگاهی (in vitro) در این تحقیق اشاره نمود که در مطالعات آینده به‌کارگیری روش‌های درون تنی (in vivo) برای بررسی دقیق‌تر اثرات مسمومیت‌زایی و ایجاد بیماری و در نتیجه نظارت بر پیشگیری و کنترل آلودگی باکتریایی را می‌توان پیشنهاد نمود.

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر گرچه شیوع پایین باکتری *باسیلوس سرئوس* در ماهی قزل‌آلا را نشان داد، اما فراوانی بالای حضور ژن‌های *nheA* و *cytK* در باکتری‌های جداسازی شده، نشانگر حضور عوامل بیماری‌زا و در نتیجه الودگی جدی در ماهی‌ها بودند. هم‌چنین، با توجه به وجود توانایی انتقال افقی این ژن‌ها از یک باکتری به باکتری دیگر، فراوانی حضور ژن‌های بیماری‌زا می‌تواند در درمان سایر عفونت‌های حاصل توسط دیگر باکتری‌ها، نیز ایجاد مشکل نماید و سبب مشکلات اساسی در سلامت افراد جامعه گردد. بنابراین، ضرورت تدابیر بیشتر در جهت جلوگیری از آلودگی غذاها به باکتری *باسیلوس سرئوس* پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

از کلیه مسئولان و اعضای محترم گروه ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و آزمایشگاه ژن پژوهان ابن سینا که در مراحل اجرای این پروژه همکاری و بذل توجه فرمودند سپاس‌گزاری می‌گردد. مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی بود.

حامی مالی: در انجام این پروژه هیچ حامی مالی وجود نداشت.

تعارض منافع: مقاله فاقد هر گونه تعارض منافع است.

ملاحظات اخلاقی (کد اخلاق): این مطالعه، مستخرج از پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی با مجوز کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال به شماره IR.IAU.TNB.REC.1403.135 و تصویب شده در گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم زیستی دانشگاه ازاد اسلامی واحد تهران شمال بود.

مشارکت نویسندگان

- **طراحی ایده:** الهام سیاسی
- **روش کار:** الهه دانشور
- **جمع‌آوری داده‌ها:** الهه دانشور
- **تجزیه و تحلیل داده‌ها:** الهام سیاسی
- **نظارت:** لعیا تکبیری
- **مدیریت پروژه:** الهام سیاسی
- **نگارش پیش‌نویس اصلی:** الهام سیاسی
- **نگارش – بررسی و ویرایش:** الهام سیاسی، لعیا تکبیری

CCBY-NC.4.0 DEED

References

1. Rasool U, Ajaz A, Badroo GA, Mir Mudasir S, Mustafa R. Isolation and Identification of Bacillus cereus from fish and their handlers from Jammu, India. *Inter J Curren Microb Appl Sci* 2017; 6: 441-7.
2. Hassanien FS, Hassan MA; El-Hariri MD, Eid Sayed. Incidence and toxigenic profile of Bacillus cereus in some fishes. *Benha Veterin Med J* 2018; 34(1): 420-9.
3. Özdemir F, Arslan S. Molecular Characterization and Toxin Profiles of Bacillus spp. Isolated from Retail Fish and Ground Beef. *J Food Sci* 2019; 84: 548-56.
4. Zhang Y, Chen M, Yu P, Yu S, Wang J, Guo H, et al. Prevalence, Virulence Feature, Antibiotic Resistance and MLST Typing of Bacillus cereus Isolated From Retail Aquatic Products in China. *Front Microbiol* 2020; 11: 1513.
5. Ragab AM, Basyoni MR, Khoris EAI, Elghany NA. The effect of *Bacillus cereus* organism on fish and its effect on human health. *Adv Anim Vet Sci* 2020; 10(5): 1135-45.
6. Tuipulotu DE, Anukriti Mr, Ngo C, Man SM. Bacillus cereus: epidemiology, virulence factors, and host–pathogen interactions. *Trends Microb* 2021; 29: 458-71.
7. Abou Zeid M, Samir A, Ezzat Hassan A. Rapid Molecular Technique for Detection of Foodborne Bacillus cereus Pathogen. *Iran J Med Micro biol* 2023; 17(3): 346-53.
8. Nguyen AT, Tallent SM. Screening food for Bacillus cereus toxins using whole genome sequencing. *Food Microbiol* 2019; 78: 164-70.
9. Jung Su-Mi, Kim N, Cha I, Na HY, Tae Chung G, Sun Kawk H, et al. Surveillance of Bacillus cereus Isolates in Korea from 2012 to 2014. *Osong public health research perspect* 2017; 8: 71-7.
10. Amor GB, Sophie Jan M, Baron F, Grosset N, Culot A, Gdoura R, et al. Toxigenic potential and antimicrobial susceptibility of Bacillus cereus group bacteria isolated from Tunisian foodstuffs. *BMC Microbiol* 2019; 19: 196.
11. Yu S, Yu P, Wang J, Li C, Guo H, Liu C, et al. A Study on Prevalence and Characterization of Bacillus cereus in Ready-to-Eat Foods in China. *Front Micro biol* 2020; 10: 3043.
12. Hui G, Yu P, Yu S, Wang J, Zhang J, Zhang Y, et al. Incidence, toxin gene profiling, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of Bacillus cereus isolated from quick-frozen food in China. *LWT* 2021; 140: 110824.
13. Mascarenhas DS, Renato L, Vivoni AM, Caetano RG, Rusak LA, Alvarenga VO, et al. Molecular characterization and toxigenic profiles of Bacillus cereus isolates from foodstuff and food poisoning outbreaks in Brazil. *Brazilian J Microb* 2024; 1-9.
14. Zheng Zh, Ye L, Xiong W, Hu Q, Chen K, Sun R, et al. Prevalence and genomic characterization of the Bacillus cereus group strains contamination in food products in Southern China. *Sci Total Environ* 2024; 921: 170903.

CCBY-NC.4.0 DEED

15. Sornchuer P, Saninjuk K, Amonyingcharoen S, Ruangtong J, Thongsepee N, Martviset P, et al. Whole Genome Sequencing Reveals Antimicrobial Resistance and Virulence Genes of Both Pathogenic and Non-Pathogenic B. cereus Group Isolates from Foodstuffs in Thailand. *Antibiotics* 2024; 13: 245.
16. Sena C, Geniş B, Tuncer BO, Tuncer Y. Prevalence, Toxin Genes, and Antibiotic Resistance Profiles of Bacillus cereus Isolates from Spices in Antalya and Isparta Provinces in Türkiye. *India J Microb* 2023; 63: 549-61.
17. Laurenda C, Chase H, Gieseker C, Hasbrouck N, Stine CB, Ewing-Peeples LJ, et al. Analysis of enterotoxigenic Bacillus cereus strains from dried foods using whole genome sequencing, multi-locus sequence analysis and toxin gene prevalence and distribution using endpoint PCR analysis. *Int J Food Microbiol* 2018; 284: 31-9.
18. Rasoulpour T, Mahdavi S. Study of frequency of NHE complex genes in *Bacillus cereus* isolated from milk in Tabriz city in spring, 2017. *JFM* 2019; 4: 1-7.
19. Fox D, Mathur A, Xue Y, Liu Y, Tan WH, Feng S, et al. Bacillus cereus non-hemolytic enterotoxin activates the NLRP3 inflammasome. *Nat Commune* 2020; 11(1): 760.
20. Yan Zh, Sun L. Bacillus cereus cytotoxin K triggers gasdermin D-dependent pyroptosis. *Cell Death Discovery* 2022; 8: 305.
21. Fagerlund A, Ween O, Lund TP, Hardy S, Per E. Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in Bacillus cereus. Granum. *Microbiology* 2004; 150: 2689-97.
22. Marcel K, Hinnekens P, Jovanovic J, Rajkovic A, Mahillon J. New insights into the potential cytotoxic role of Bacillus cytotoxicus cytotoxin K-1. *Toxins* 2021; 13: 698.
23. Mohammadi R, Dadgar T, Pordeli HR, Yazdansetad S, Najafpour R, Faraj Tabrizi E. Isolation and molecular identification of Bacillus cereus and Bacillus subtilis as pectinase-producing bacteria from various regions of Golestan province. *J Mol Cell Res* 2017; 29(3): 340-8.
24. Mekonnen YB, Aspholm ME, Zegeye ED. High-quality genomic DNA extraction protocol for Bacillus and Clostridium species. *Current Protocol* 2024; 4: e70027.
25. Bavykin SG, Lysov YP, Zakharive V, Kelly J, Jackmam J, Stahel DA, et al. Use of 16s rRNA, 23s rRNA and gyrB gene sequence analysis to determine phylogenetics relationship of Bacillus cereus group microorganisms. *J Clin Microb* 2004; 42(8): 3711-30.

David EE, Igwenyi IO, Iroha IR, Martins LF, Uceda-Campos G, da Silva AM. Bacillus cereus containing nheA, hblC and cytk enterotoxin genes is associated with acute childhood gastroenteritis in Nigeria. *Indian J Med Microb* 2024; 51: 100666.

CCBY-NC.4.0 DEED

Study of *nheA* and *cytK* Genes Frequency in *Bacillus Cereus* Isolated from Fresh Rainbow Trout Supplied in Fish Distribution Centers in Tehran: A Laboratory Study

Elham Siasi [1], Elahe Daneshvar [2], Laya Takbiri [3]

Received: 03/11/25 Sent for Revision: 30/12/25 Received Revised Manuscript: 28/03/26 Accepted: 29/03/26

Background and Objectives: Seafood has a very high nutritional value and can have effect on social health. *Bacillus cereus* is one of the most important pathogens of seafood poisoning. This study was aimed to study *nheA* and *cytK* genes frequency in *Bacillus cereus* isolated from fresh rainbow trout.

Materials and Methods: In this in vitro study, thirty samples of fresh rainbow trout, supplied in fish distribution centers in Tehran, were randomly collected in 2024, and transferred to the laboratory. The samples were cultured in BHI (Brain heart infusion) agar medium. Then colonies were cultured in MYP (Mannitol egg Yolk Polymyxin) agar-specific medium, and Gram staining, catalase testing, and PCR targeting the 16S rRNA gene were performed to isolate and identify *Bacillus cereus*. Sequencing of the 16S rRNA gene, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analysis using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database, and phylogenetic analysis using MEGA 6.0 were performed, and virulence genes (*nheA* and *cytK*) were identified by PCR in the isolated *Bacillus cereus* bacteria. Data was analyzed by t-test.

Results: From 30 studied samples, 2 samples (6.66%) of *Bacillus cereus* were isolated and identified, and 100% of them carried nheA and cytK pathogen genes.

Conclusion: The present study indicated that preventing contamination of seafood with *Bacillus cereus* is essential, as all isolated strains carried virulence genes. Further research on this topic is recommended.

Keywords: *Bacillus cereus*, *nheA* and *cytK* genes, Rainbow trout

Funding: This study did not have any funds.

Ethical approval: The Ethics Committee of NT.C., Islamic Azad University, Tehran Branch, approved the study (IR.IAU.TNB.REC.1403.135).

Conflict of interest: None declared.

Authors' contributions:

- Conceptualization: Elham Siasi

- Methodology: Elahe Daneshvar

- Data collection: Elahe Daneshvar

- Formal analysis: Elham Siasi

- Supervision: Laya Takbiri

- Project administration: Elham Siasi

- Writing – original draft: Elham Siasi

- Writing – review & editing: Elham Siasi, Laya Takbiri

Citation: Siasi E, Daneshvar E, Takbiri L. Study of nheA and cytK Genes Frequency in Bacillus Cereus Isolated from Fresh Rainbow Trout Supplied in Fish Distribution Centers in Tehran: A Laboratory Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2026 Apr; 25 (1): 51-62. doi: 10.66224/jrums.25.1.51. [Farsi]

1- Associate Prof., Dept. of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
ORCID:0000-0003-2204-0508
(Corresponding Author) Tel: 09124056746, E-mail: emi_biotech2006@yahoo.ca
2- MSc, Dept. of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
3- Assistant Prof., Dept. of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, NT.C., Islamic Azad University, Tehran

CCBY-NC.4.0 DEED