Short Communication

Detection of NHE Complex Genes in *Bacillus cereus* Isolated from Rice Samples from Zanjan, Iran by Multiplex PCR

Zahra Deilami Khiabani[1*], Enayat Noori[2], Mehdi Rahnama[3], Reza Shapouri[1], Yadollah Bigdelo[2], Dena Ghamari[4], Hava Asefi[2]

1- Assistant Professor, Biology Research Center, Zanjan Branch of Islamic Azad University, Zanjan, Iran

2- M.Sc. Student, Department of Microbiology, Zanjan Branch of Islamic Azad University, Zanjan, Iran

3- Associated Professor, Biology Research Center, Zanjan Branch of Islamic Azad University, Zanjan, Iran

4- M.Sc., Biology Research Center, Zanjan Branch of Islamic Azad University, Zanjan, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 4515658145, Biology Research Center, Zanjan Branch of Islamic Azad University, Zanjan, Iran*
Email: zdeilami@yahoo.com

Received: 15/Aug/2011, Accepted: 09/Apr/2012

Abstract

Objective: *Bacillus cereus (B. cereus)* is a gram-positive, spore-forming bacteria widely distributed in the environment. This bacteria is an opportunistic human pathogen that can cause diarrheal and emetic types of food poisoning. The diarrhea type of food poisoning can be caused by hemolysin BL (HBL), non-hemolytic (NHE), and cytotoxin K enterotoxins. Rice is commonly contaminated with *B. cereus*. The objective of this study is to detect enterotoxigenic genes of the NHE complex and assess their incidence in *B. cereus* isolates in rice samples from Zanjan, Iran.

Methods: We randomly purchased 10 different rice samples from food stores and cultured them in PEMPA. Following biochemical testing, the bacterial colonies were identified by PCR. *B. cereus* isolates were checked for the NHE complex genes by specific primers using multiplex PCR.

Results: Results showed that rice samples were contaminated with *B. cereus.* The NHE complex genes were found in 8 bacterial samples.

Conclusion: *B. cereus* is able to tolerate high temperatures; in cooked rice the spores can undergo germination by reheating. The results of this study have shown that NHE multiplex PCR is a prompt, reliable method for the differentiation between non-enterotoxigenic and enterotoxigenic isolates of *B. cereus*. Despite its common dietary role, rice in Iran has rarely been investigated from a microbiological point of view. Enhancing awareness about virulence and prevalence of genes involved in food poisoning would be effective in the prevention of food poisoning.

Keywords: *Bacillus cereus*, Rice, NHE Complex, Multiplex PCR

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 14, No 4, Winter 2012, Pages: 89-97

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]

مقاله کوتاه

شناسایی ژن‌های کمپلکس NHE در باسیلوس سرئوس‌های جدا شده از برنج در استان زنجان با روش PCR چندگانه

زهرا دیلمی‌خیابانی[1*]، عنایت نوری[2]، مهدی رهنما[3]، رضا شاپوری[1]، یداله بیگدلو[2]، دنا قمری[4]، حوا آصفی[2]

۱- استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
۴- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران

آدرس نویسنده مسئول: ایران، زنجان، کدپستی: ٤٥١٥٦٥٨١٤٥، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، مرکز تحقیقات بیولوژی
Email: zdeilami@yahoo.com

دریافت مقاله: ۹۰/۰۵/۲۵ پذیرش مقاله: ۹۱/۰۱/۲۱

چکیده

هدف: باسیلوس سرئوس باکتری گرم مثبت و اسپورزایی است که به‌طور وسیعی در طبیعت انتشار دارد. بسیاری از سویه‌های این باکتری باعث مسمومیت غذایی با علایم اسهال و استفراغ می‌شوند. بیماری‌های نوع اسهالی توسط انتروتوکسین‌های همولیزین HBL، غیرهمولیتیک NHE و سیتوتوکسین K ایجاد می‌شود. برنج یکی از غذاهای پرمصرف در ایران است که ممکن است توسط باسیلوس سرئوس آلوده شود. هدف از این تحقیق بررسی حضور ژن‌های انتروتوکسیژنیک کمپلکس NHE باسیلوس سرئوس‌های جدا شده در تعدادی برنج‌های خریداری شده استان زنجان بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ده نمونه برنج به‌طور تصادفی از فروشگاه‌ها خریداری شد. از هر نمونه برنج و با استفاده از محیط کشت انتخابی (PEMPA)، باسیلوس سرئوس جداسازی شد. روی این کلونی‌های جدا شده آزمون‌های تأییدی بیوشیمیایی انجام گرفت، همچنین تشخیص مولکولی باسیلوس سرئوس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد. سپس نمونه‌های تأیید شده از نظر باسیلوس سرئوس برای ژن‌های کمپلکس NHE با آغازگر های اختصاصی و با روش PCR چندگانه بررسی شدند.

نتایج: مطابق یافته‌ها تمام نمونه‌های برنج مورد مطالعه با باکتری‌های باسیلوس سرئوس آلوده بودند و در هشت نمونه از باکتری‌های جدا شده ژن‌های کمپلکس NHE مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به این که باسیلوس سرئوس می‌تواند دماهای بالا را تحمل کند، در برنج پخته شده اسپورها می‌توانند در اثر حرارت مجدد جوانه بزنند. PCR چندگانه برای کمپلکس NHE روش سریع و مطمئنی برای شناسایی باسیلوس سرئوس انتروتوکسیژنیک از غیرانتروتوکسیژنیک است. با وجود آن‌که برنج رژیم اصلی ایران است، مطالعه کمّی از نظر میکروبیولوژی روی این ماده غذایی صورت گرفته است. افزایش اطلاعات درباره بیماری‌زایی و شیوع ژن‌های مهم در مسمومیت غذایی می‌تواند در پیشگیری از مسمومیت‌های غذایی مؤثر باشد.

کلیدواژگان: باسیلوس سرئوس، برنج، ژن‌های کمپلکس NHE، PCR چندگانه

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰، صفحات: ۸۹-۹۷

مقدمه

باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*) باسیل گرم مثبت، اسپوردار و هوازی بی‌هوازی اختیاری از خانوادهٔ باسیلاسه (Bacillaceae) است. این باکتری متحرک، از نظر واکنش همولیتیک مثبت، کاتالاز مثبت، مقاوم به پنی‌سیلین و فاقد رشد به شکل ریزوئید است. دمای مناسب رشد این باکتری ۳۰ تا ۳۵

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]

درجه سانتی‌گراد است ولی تا دمای ٤٨ درجه سانتی‌گراد و در دمای پایین‌تر از ٧ درجه سانتی‌گراد نیز قادر به رشد است [١، ٢]. باسیلوس سرئوس یکی از مهم‌ترین بیماری‌زاهای مواد غذایی مختلف همچون لبنیات، مواد گوشتی، غلات و از جمله برنج است. این باکتری دو نوع مختلف مسمومیت غذایی یعنی نوع اسهالی و تهوع را در انسان ایجاد می‌کند. اسپورهای این باکتری حتی پس از پختن در غذا باقی می‌مانند و در صورتی که مواد غذایی در شرایط گرم و مرطوب نگهداری شود، اسپور جوانه زده و نوعی سم روده‌ای (انتروتوکسین) تولید می‌کند که منجر به مسمومیت غذایی می‌شود [٣-٥]. توکسین‌هایی که منجر به بروز این بیماری‌ها می‌شود شامل سیتوتوکسین K (Cytotoxin k: Cyt k)، انتروتوکسین FM (Enterotoxin FM: Ent FM)، توکسین استفراغی همولیزین BL (Hemolysin BL: HBL) و انتروتوکسین غیرهمولیتیکی (Non-Hemolytic Enterotoxin: NHE) است. پروتئین‌های Cyt K و کمپلکس NHE و به‌عنوان اولین فاکتور ویرولانس در باسیلوس سرئوس اسهالی است.

کمپلکس NHE سه جزیی بوده و شامل دو جزء لیتیکی A، B و پروتئین C با عملکرد ناشناخته است که به‌ترتیب توسط ژن‌های *nhe*A، *nhe*B و *nhe*C کد می‌شوند. هر سه پروتئین ترکیبی یعنی A، B و C برای حداکثر فعالیت NHE مورد نیاز است [٢، ٣، ٦، ٧]. توکسین سه جزیی NHE برای اولین بار از سویهٔ باسیلوس سرئوس در یک مسمومیت غذایی در نروژ جدا شد. پروتئین‌های این توکسین متفاوت از HBL بود و فعالیت همولیتیکی آشکاری نداشت [٨].

در سال ٢٠٠٧ داس (Das) و همکارانش در هند رابطه بین تولید انتروتوکسین اسهالی و حضور ژن‌های بیماری‌زای متفاوت در باسیلوس سرئوس‌های جدا شده از غذاهای دریایی را بررسی کردند. همهٔ جدایه‌های تولید کنندهٔ انتروتوکسین اسهالی حضور ژن‌های کمپلکس NHE را نشان دادند در حالی که جدایه‌های غیرانتروتوکسیک فاقد این ژن بودند [٤] همچنین در سال ٢٠٠٨ نگامونگساتیت (Ngamwongsatit) و همکارانش در تایلند با روش PCR وسعت گستردگی پنج ژن انتروتوکسین *nhe*ABC، *cyt*K، *ent*FM را در باسیلوس سرئوس و باسیلوس تورنجینسیس (*Bacillus thuringiensis*) بررسی کردند و نتیجه گرفتند پراکندگی این ژن‌ها در هر دو گروه باسیلوس‌ها یکسان است [٣]

برنج در آسیا و به‌ویژه ایران رژیم غذایی اصلی مردم است که می‌تواند در مراحل مختلف با این باکتری آلوده شود.

این ماده غذایی در انبار با رطوبت ١٢-١٤ درصد نگهداری می‌شود. در این حالت امکان تکثیر اشکال رویشی باسیلوس سرئوس وجود ندارد ولی اسپورها قادر به بقا در این شرایط و شرایط پخت طبیعی هستند. برنج آسیاب شده حتی در شکل پالایش یافته یک منبع اصلی برای این ارگانیسم است. زمانی که برنج در آب، شیر، تخم مرغ یا سایر ترکیبات آب‌دار پخته می‌شود یک محیط مناسب برای جوانه‌زنی اسپور، رشد ارگانیسم و تولید توکسین ایجاد می‌شود. گرم کردن مجدد برنج تعداد باکتری‌های رویشی را کاهش می‌دهد اما توکسین مقاوم به حرارت مولد استفراغ و اسهال را غیرفعال نمی‌کند [٦، ٩-١٢]. در بیماری نوع اسهالی انتروتوکسین غیر همولیتیک NHE دخالت دارد که هدف از این مطالعه شناسایی ژن‌های کمپلکس NHE در باسیلوس سرئوس‌های جدا شده از تعدادی نمونه‌های برنج در ایران است.

در مطالعه حاضر وجود باسیلوس سرئوس‌ها در ده نمونه برنج خریداری شده از تعدادی از فروشگاه‌های استان زنجان بررسی و ژن تولید کننده انتروتوکسین غیرهمولیتیک در جدایه‌های مختلف باسیلوس سرئوس‌های جدا شده ارزیابی شد. برای این مطالعه از آغازگرهای (Primer) اختصاصی ژن‌های کمپلکس NHE و روش PCR چندگانه (Multiplex PCR) استفاده شد [٣، ١١، ١٣].

با در نظر گرفتن این که برنج جزء مهم‌ترین رژیم غذایی مردم ایران است، نتایج این مطالعه می‌تواند در ایجاد اطلاعات در زمینه شیوع ژن‌های انتروتوکسین در برنج‌های مصرفی مفید باشد و همچنین زمینه‌ای برای بررسی‌های آینده از جمله درک

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]

بیماری‌زایی باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی باسیلوس سرئوس از نمونه های برنج

پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، ۱۰ گرم از هر نمونه برنج با ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و بعد از ته‌نشین شدن برنج رقت‌های 10^{-1}، 10^{-2} و 10^{-3} از آن‌ها تهیه شد [۱٤]. در برنج پخته نیز مثل روش جمع‌آوری نمونه‌های باکتریایی از برنج خام عمل شد با این تفاوت که در برنج پخته ابتدا برنج خام در آب ریخته و روی شعله قرار داده شد و بعد از ۲۰ دقیقه آب‌کش شد و نمونه‌ها به‌مدت یک شبانه روز در دمای آزمایشگاه در شرایط استریل نگهداری شد (برای تبدیل اسپور باسیلوس سرئوس به حالت رویشی و سمّی شدن) سپس از این برنج، مثل برنج خام رقت تهیه شد [۲، ٤]. از رقت‌های تهیه شده ۱ میلی‌لیتر در لوله‌های حاوی محیط BHI (Brain Heart Infusion) مایع (محیط غنی کننده) منتقل شد و به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری صورت گرفت. سپس یک لوپ از محیط حاوی باکتری روی محیط PEMPA (Polymixin-Pyruvate-Egg Yolk-Mannitol-Bromocresol Purple Agar) کشت داده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤۸ ساعت قرار گرفت. بعد از این مدت کلونی‌های صورتی دارای هالهٔ لسیتیناز (Lecithinase) به محیط نوترینت آگار منتقل شدند و رنگ‌آمیزی گرم و اسپور و همچنین آزمایش‌های بیوشیمیایی شامل آزمون‌های کاتالاز، تحرک، احیای نیترات، آمیلاز (هیدرولیز نشاسته) و همولیز بتا (محیط آگار حاوی خون گوسفندی) انجام و برای اطمینان، سه بار تکرار شد [۲، ٤].

استخراج DNA برای واکنش PCR

استخراج DNA از باسیلوس سرئوس با استفاده از روش انجماد و جوش انجام گرفت. در این روش ابتدا باکتری‌ها در محیط نوترینت آگار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱٦ ساعت کشت شدند. به اندازهٔ ۱ لوپ از کلونی برداشته و در ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر اتوکلاو شده معلق شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد و در مرحلهٔ بعد به‌مدت ۱۰ دقیقه در در داخل آب جوش ۱۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس به‌مدت ۱۰ ثانیه در ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه عمل سانتریفوژ انجام شد. مایع رویی حاوی DNA است، فاز رویی به میکروتیوب‌های جدید انتقال یافتند [۲، ٤].

واکنش‌های PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی باسیلوس سرئوس

پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی و مشخص شدن کلونی‌های باسیلوس سرئوس، برای تأیید کلونی این باکتری با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آن، PCR با آغازگرهای زیر برای ۱۰ نمونه با سه بار تکرار انجام گرفت [۲، ٤، ۱٤-۲۰] (جدول ۱).

جدول ۱ آغازگرهای اختصاصی گروه باسیلوس سرئوس

*Bal*F	5'- TGCAACTGTATTAGCACAAGC T -3'	گروه باسیلوس سرئوس
*Bal*R	5'- TACCACGAAGTTTGTTCACTACT -3'	

برای انجام این واکنش PCR مخلوط واکنش شامل بافر PCR (۵ میلی‌مول KCl، ۹ pH و Tris-HCl ۱ میلی‌مول)، ۱/۵ میلی‌مول $Mgcl_2$، ۲/۵ میلی‌مول dNTP، آغازگر رفت (۱۰ پیکومول)، آغازگر برگشت (۱۰ پیکومول)، آنزیم Taq پلیمراز (۵ واحد در میکرولیتر)، DNA (۲۰ نانوگرم در میکرولیتر) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه شد [۲، ٤].

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]

برنامه دمایی دستگاه ترمال سایکلر شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه، واسرشته‌سازی در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤٥ ثانیه، اتصال آغازگر به رشته‌های الگو در دمای ٥٥ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، بسط رشتهٔ DNA توسط پلیمراز در ۷۲ سانتی‌گراد برای ٤٥ ثانیه که سه مرحله اخیر ۳۰ بار تکرار گردید و در نهایت با بسط نهایی در ۷۲ سانتی‌گراد برای ۲ دقیقه واکنش‌ها اتمام یافت [۲، ٤].

در ادامه محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد.

واکنش‌های PCR چندگانه با استفاده از آغازگرهای ژن‌های کمپلکس NHE (*nheC*،*nheB*،*nheA*) باسیلوس سرئوس

برای انجام این واکنش پس از استخراج از نمونه‌ها به روش انجماد- جوش از آغازگرهای ژن‌های *nheA*، *nheB* و *nheC* استفاده شد که این آغازگرها عبارتند از:

nheA–S *nheA*: F-ATTAAGGTAAATGCGATGAG
nheA-A: R-GCTTCAGTTTGTGATAACTT
nheB–S *nheB*: F-CTATCAGCACTTATGGCAG
nheB–A: R-ACTCCTAGCGGTGTTCC
nheC–S *nheC*: F-CGGTAATGATTGCTGGG
nheC–A: R-CAGCATTCGTACTTGCCAA

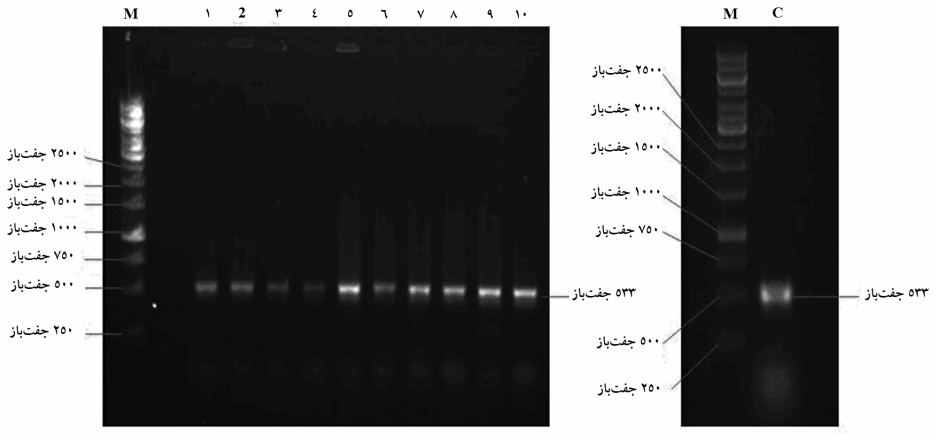
مخلوط واکنش PCR با آغازگرهای فوق مطابق با بند ۲-۳ تهیه شد. برنامه دمایی دستگاه ترمال سایکلر شامل واسرشته‌سازی اولیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد برای ۲ دقیقه، واسرشته‌سازی در ۹٤ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، اتصال آغازگر به رشته‌های الگو در ٥٦ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، بسط رشتهٔ DNA توسط پلیمراز در ۷۲ سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه که سه مرحله اخیر ۳۰ بار تکرار شد و در نهایت با بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ٤ دقیقه واکنش‌ها اتمام یافت [۲، ٤].

نتایج

نتایج مربوط به جداسازی باسیلوس سرئوس

بعد از کشت نمونه‌های برنج خام و پخته روی محیط PEMPA، کلونی‌هایی به رنگ صورتی و با هالهٔ رسوبی لسیتیناز روی این محیط رشد نمودند.

این کلونی‌ها به محیط کشت نوترینت آگار منتقل شدند تا برای جداسازی دقیق‌تر مورد آزمون‌های بیوشیمیایی اشاره شده در بخش مواد و روش‌ها قرار گیرند. سپس برای اطمینان با سه بار تکرار، آزمون‌هایی بیوشیمیایی برای تأیید باسیلوس سرئوس صورت گرفت که واکنش همگی مثبت شدند.



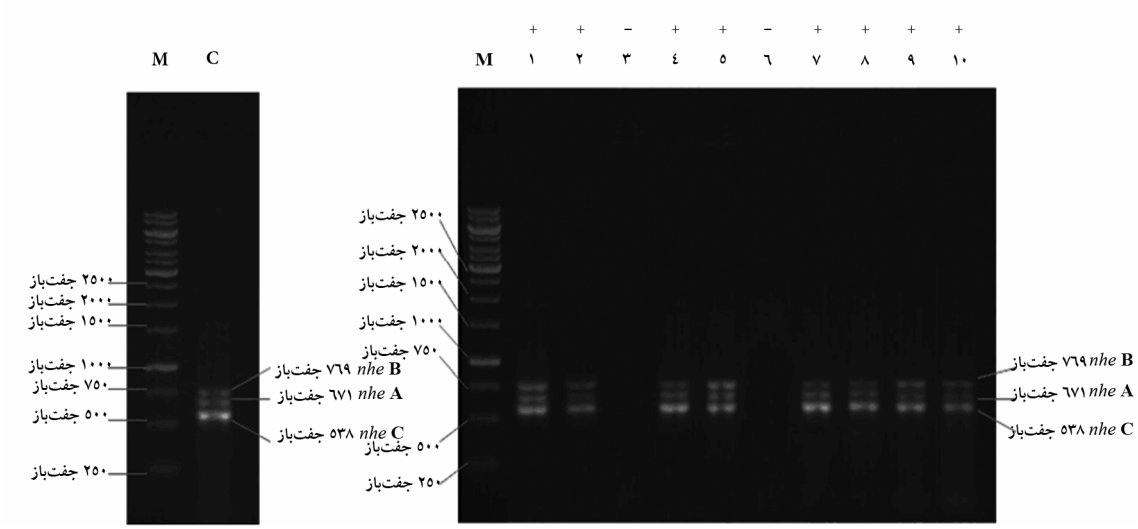
شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR از باسیلوس سرئوس‌های جدا شده از نمونه‌های برنج پخته و خام با استفاده از آغازگرهای مخصوص جنس؛ ردیف ٥-۱ نمونه‌های برنج خام و ردیف ٦-۱۰ مربوط به نمونه‌های برنج پخته مورد مطالعه که با آغازگرهای *Bal*F/*Bal*R باند ٥۳۳ جفت‌باز را نشان دادند. M) نشانگر ۱ کیلوباز، C) کنترل مثبت

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]

PCR با آغازگرهای اختصاصی برای تأیید کلونی‌های باسیلوس سرئوس

روی DNA های استخراج شده، با استفاده از آغازگر اختصاصی باسیلوس سرئوس واکنش‌های PCR انجام گرفت. سپس محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد مطالعه شدند. باسیلوس سرئوس جدا شده از نمونه‌های برنج خام و پختهٔ ایرانی و وارداتی در PCR با آغازگرهای اختصاصی قطعهٔ ۵۳۳ جفت‌بازی را نشان دادند.

شکل ۱ الکتروفورز باسیلوس سرئوس‌های جدا شده از نمونه‌های برنج خام و پخته را با استفاده از آغازگرهای *Bal*F/*Bal*R نشان می‌دهد. کنترل مثبت استفاده شده در این مطالعه، مربوط به باسیلوس سرئوس انتروتوکسیژنیک است که در آزمایشگاه جداسازی شده و حضور ژن‌های کمپلکس NHE و HBL در آن تأیید شده است.



شکل ۲ نتیجهٔ الکتروفورز مربوط به PCR چندگانه با آغازگرهای ژن‌های *nheA*، *nheB* و *nheC* برای باسیلوس سرئوس‌های جدا شده از ده نمونه برنج پخته شده است. برای نمونه‌های شماره ۳ و ٦ باندی مشاهده نشد. M) نشانگر ۱ کیلوبازی، C) کنترل مثبت

PCR چندگانه با آغازگرهای ژن‌های *nheA*، *nheB* و *nheC*

در این واکنش باسیلوس سرئوس‌های جدا شده، با آغازگرهای ژن‌های *nheA*، *nheB* و *nheC* و روش PCR چندگانه بررسی شدند. از ده نمونه برنج پخته شده، در هشت نمونه (۵ نمونه ایرانی و ۳ نمونه مربوط به برنج‌های خارجی) وجود ژن‌های *nheA* با اندازهٔ ٦٧١ جفت‌باز، *nheB* با اندازهٔ ٧٦٩ جفت‌باز و *nheC* با اندازهٔ ۵۸۳ جفت‌باز مشاهده شد و دو نمونه که هر دو از برنج‌های خارجی بودند از نظر وجود این ژن‌ها منفی شدند (شکل ۲).

بحث

غلات یکی از مهم‌ترین منابع کربوهیدراتی در رژیم غذایی انسان است و برنج از غلاتی است که به‌طور گسترده در ایران مصرف می‌شود. باسیلوس سرئوس باکتری موجود در خاک است و امکان آلودگی برنج طی مراحل رشد، برداشت با این باکتری وجود دارد [۲-۵]. طی پخت اولیهٔ برنج، اسپورها زنده مانده و طی نگهداری جوانه زده و رشد می‌نمایند و سم مولد

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]

اسهال و استفراغ را تولید می‌نمایند.

هدف از مطالعه حاضر بررسی حضور باسیلوس سرئوس انتروتوکسیژنیک در تعدادی از برنج‌های مصرفی ایران بود. ۲۰ جدایه باسیلوس سرئوس از برنج‌های مورد مطالعه به حالت خام و پخته، محصول PCR ۵۳۳ جفت‌بازی که با آغازگرهای اختصاصی باسیلوس سرئوس تکثیر شده بود، نشان دادند. داس و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۹ از این آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی باسیلوس سرئوس‌های جدا شده از غذاهای دریایی در کشور هند استفاده کردند و همهٔ ٤۲ جدایه‌ها با استفاده از این آغازگر اختصاصی محصول PCR ۵۳۳ جفت‌بازی نشان دادند [٤].

یافته‌های بررسی حاضر در مورد ده نمونه برنج پخته نشان داد که ۸۰ درصد نمونه‌های برنج در حالت پخته از نظر حضور کمپلکس NHE مثبت بود در حالی که در همین نمونه‌ها در حالت خام، این ژن‌ها مشاهده نشد.

در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۷ در کشور چین انجام شد، وجود باسیلوس سرئوس در ٥٤ نمونه از شیرهای پاستوریزه نشان داده شد و در نهایت نتایج PCR مشخص نمود که ۷۱/۱ درصد نمونه‌ها نسبت به ژن *nhe*A، ٦۲ درصد نسبت به ژن *nhe*B و ۷۱/۷ درصد نسبت به ژن *nhe*C مثبت هستند [۷]. همچنین گیتاهی (Gitahi) و همکارانش سال ۲۰۰۹ در کنیا حضور کمپلکس NHE را در تولیدات شیر و پنیر و برنج پخته مطالعه کردند و از ۵۱ نمونهٔ باسیلوس سرئوس جدا شده ۱۲ نمونه (۳۳/۳ درصد) از شیر و ۸ نمونه (۲۲/۲ درصد) از پنیر و ۳۱ نمونه (٦۰/۷ درصد) از برنج بودند [۲۰].

در سال ۲۰۰۹ آنکوله‌کار (Ankolekar) و همکارانش تعداد ۸۳ باسیلوس سرئوس را از ۹٤ نمونهٔ برنج توسط آزمون‌های بیوشیمیایی و PCR در آمریکا جدا کردند. ۷٤ نمونه یعنی ۸۹/۱ درصد از باسیلوس سرئوس جدا شده دارای ژن‌های کمپلکس NHE بودند [۲]. به‌طور نسبی می‌توان گفت که نتایج بررسی حاضر با نتایج آنکوله‌کار و همکارانش مشابهت دارد.

در این مطالعه هیدرولیز نشاسته توسط تمام جدایه‌های حاوی کمپلکس NHE مشاهده شد. این ویژگی در تمام جدایه‌های انتروتوکسیژنیک باسیلوس سرئوس وجود دارد [٤]؛ چرا که در مطالعه دیگری ارتباط بین هیدرولیز نشاسته و تولید انتروتوکسین توسط باسیلوس سرئوس در مواد غذایی مختلف از جمله برنج پخته شده نشان داده شده است [۲۱].

روش سریع برای تشخیص حضور باسیلوس سرئوس انتروتوکسیژنیک در غذا از اهمیت زیادی برخوردار است تا از سلامتی غذای مصرفی اطمینان حاصل شود. روش مرسوم در تفکیک سویه‌های باسیلوس سرئوس انتروتوکسیژنیک و غیرانتروتوکسیژنیک آزمون RPLA (Reversed Passive Latex Agglutination) است که استفاده از آن از لحاظ زمانی طولانی است [٤]. اما PCR روش سریع و قابل اطمینان برای تشخیص حضور ارگانیسم‌های خاص است. استفاده از واکنش PCR چندگانه براساس ژن‌های کمپلکس NHE سریع‌تر و ارزان‌تر از کیت‌های آزمایشی برای تشخیص انتروتوکسین نتیجه می‌دهد.

منابع

[1] Florişţean V, Creţu C, Carp-Cărare M. Bacteriological characteristics of *Bacillus cereus* isolates from poultry. Bulletin USAMV-CN 2007; 64(1/2): 425-30.

[2] Ankolekar C, Rahmati T, Labbé RG. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. Int J Food Microbiol 2009; 128(3): 460-6.

[3] Ngamwongsatit P, Buasri W, Pianariyanon P, Pulsrikarn C, Ohba M, Assavanig A, Panbangred W. Broad distribution of enterotoxin genes (*hbl*CDA, *nhe*ABC, *cyt*K, and *ent*FM) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. Int

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]

J Food Microbiol 2008; 121(3): 352-6.

[4] Das S, Surendran PK, Thampuran NK. PCR-based detection of enterotoxigenic isolates of *Bacillus cereus* from tropical seafood. Indian J Med Res 2009; 129(3): 316-20.

[5] Vilas-Bôas GT, Peruca AP, Arantes OM. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. Can J Microbiol 2007; 53(6): 673-87.

[6] Chang YH, Shangkuan YH, Lin HC, Liu HW. PCR assay of the *gro*EL gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells. Appl Environ Microbiol 2003; 69(3): 4502-10.

[7] Zhou G, Liu H, He J, Yuan Y, Yuan Z. The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk. Int J Food Microbiol 2008; 121(2): 195-200.

[8] Ołtuszak-Walczak E, Walczak P, Modrak R. D Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* producing hemolytic and non hemolytic enterotoxins by PCR test. Pol J Microbiol 2006; 55(2): 113-8.

[9] Lund T, Granum PE. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. FEMS Microbiol Lett 1996; 141(2-3): 151-6.

[10] Finlay WJJ, Logan NA, Sutherland AD. *Bacillus cereus* emetic toxin production in cooked rice. Food Microbiol 2002; 19(5): 431-9.

[11] Haque A, Russell NJ. Phenotypic and genotypic characterisation of *Bacillus cereus* isolates from Bangladeshi rice. Int J Food Microbiol 2005; 98(1): 23-34.

[12] Mäntynen V, Lindström K. A rapid PCR-Based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol 1998; 64(5): 1634-9.

[13] Meer RR, Baker J, Bodyfelt FW, Griffiths MW. Psychotropic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. J Food Prot 1991; 54: 969-79.

[14] Guven K, Mutlu MB, Avci O. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* in meat and meat products consumed in Turkey. J Food Safe 2006; 26(1): 30-40.

[15] Lindbäck T, Fagerlund A, Rodlandt MS, Granum PE. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. Microbiol 2004; 150: 3959-67.

[16] Guinebretière MH, Broussolle V, Nguyen-The C. Enterotoxigenic Profiles of Food-Poisoning and Food-Borne *Bacillus cereus* Strains. J Clin Microbiol 2002; 40(8): 3053–6.

[17] Wijnands LM, Dufrenne JB, van Leusden FM. Characterization of *Bacillus cereus*. RIVM report 250912002/2002. http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/250912002.pdf

[18] Wong HC. *Bacillus cereus*. http://microbiology.scu.edu.tw/wong/courses/special/ppt/BACILLUS.pdf.

[19] Hansen BM, Hendriksen NB. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. Appl Environ Microbiol 2001; 67(1): 185-9.

[20] López AC, Alippi AM. Enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium* isolates recovered from honey. Rev Argent Microbiol 2010; 42(3): 216-25.

[21] Gitahi NJ, Ombui JN, Nduati DW, Gicheru MM. Genetis characterisation of food borne *Bacillus*

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]

cereus strains from milk, cheese and rice by multiplex pcr assay. IJIB 2009; 5(2), 82-6.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]