باسیلوس سرئوس در شیر خشک نوزادان: یک مطالعه در اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل غذا و داروی وزارت بهداشت

ناهید رحیمی فرد[1*]، بهرام فتح‌اله زاده[2]، مرتضی پیرعلی همدانی[1]، زهرا نوری[1]،شهلا سعادتی[1]، مریم زوار[1]، بهناز پیروز[1]، شهناز اصغری[1]، معصومه خضری‌پور[1] ، سحر صابری[1]

۱- گروه میکروب شناسی، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، آزمایشگاه کنترل غذا و دارو، وزارت بهداشت
۲- گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

*نویسنده مسئول، تهران، خیابان امام خمینی، پلاک ۳۱، اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو
تلفن: ۶۶۴۰۰۰۸۱
email: rahimifn@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: اسپور *باسیلوس سرئوس* به صورت گسترده‌ای در طبیعت پراکنده بوده و می‌توان آن را از مواد غذایی گوناگونی جدا نمود. این باکتری تولیدکننده انتروتوکسینهای مولد اسهال و تهوع بوده و قادر به ایجاد سندرم اسهال و تهوع می‌باشد. بررسی وجود این باکتری در شیر خشک نوزادان به لحاظ سن کم مصرف‌کنندگان و احتمال بیماری‌زایی آن از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد. ***روش بررسی:*** ۶۰ نمونه شیر خشک نوزاد از نظر وجود *باسیلوس سرئوس* مورد آزمایش قرار گرفت. یک میلی‌لیتر از رقت ۰/۱ بر روی چهار پلیت فنل رد آگار دارای مانیتول، زرده تخم مرغ و سولفات پلی‌میکسین B کشت داده شد و پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه گذاشته شدند. سپس بر روی کلنی‌های مشکوک آزمونهای تاییدی انجام پذیرفت. ***یافته‌ها:*** از میان ۶۰ نمونه شیر خشک نوزاد، ۱۱ نمونه دارای بیش از ۱۰ cfu/g *باسیلوس سرئوس* و از این میان چهار نمونه حاوی بیش از 10^2 cfu/g *باسیلوس سرئوس* بود. ۴۹ نمونه دیگر دارای کمتر از ۱۰ cfu/g *باسیلوس سرئوس* بودند. ***نتیجه‌گیری:*** لازم است حد مجاز *باسیلوس سرئوس* در شیرخشک به کمتر از ۱۰ cfu/g کاهش یابد. بدین منظور پیشنهاد می‌گردد از روش ارائه شده در این مقاله و انجام آزمون‌های حساسیت به پنی‌سیلین، همولیز بتا و چگونگی رشد در 45° c جهت تایید استفاده گردد.

کلمات کلیدی: *باسیلوس سرئوس*، شیرخشک، نوزادان

مقدمه

باسیلوس سرئوس (Bacillus cereus) باسیل گرم مثبت و اسپوردار از خانواده باسیلاسه است. اسپور این باکتری به‌صورت گسترده‌ای در طبیعت، آب و خاک پراکنده شده به‌طوری که می‌توان آن را از مواد غذایی گوناگون جدا نمود. *باسیلوس سرئوس* قادر به تولید مواد خارج سلولی مانند لستیناز C و همولیزین بتا بوده که در شناسایی آن مهم می‌باشند. این باکتری مولد انتروتوکسینهای مولد اسهال و تهوع بوده و قادر به ایجاد سندرم اسهال و سندرم تهوع می‌باشد.[1-3] در ۱۹۵۰ باسیلوس سرئوس به عنوان عامل مسمومیت غذایی شناخته شد. از ۱۹۷۲ تا ۱۹۸۶، ۵۲ مورد شیوع با این باکتری به CDC گزارش شده که مسلماً میزان واقعی بسیار بیشتر از این می‌باشد. همچنین در ۱۹۹۸ تا ۱۹۹۹، ۲۲ مورد مسمومیت با این باکتری در نیوزیلند گزارش شده است. در یک مطالعه در امریکا در ۱۹۸۸ مشخص شد که ۲۹ درصد شیرهای خشک به *باسیلوس سرئوس* آلوده می‌باشد.[4] بررسی وجود میکروارگانیسم‌های مختلف در شیر خشک نوزادان به لحاظ مستعد و حساس بودن کودکان از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. از آنجایی که امکان آلودگی شیر خشک به اسپور *باسیلوس سرئوس* وجود داشته و این باکتری قادر به ایجاد مسمومیت غذایی و حتی سپتی‌سمی و منتژیت در نوزادان می‌باشد، بررسی وجود این باکتری در شیر خشک نوزادان بسیار مهم بوده و اهمیت آن کمتر از *انتروباکتر ساکازاکی* نیست. بدین منظور در این مطالعه ۶۰ نمونه شیر خشک نوزاد از لحاظ وجود *باسیلوس سرئوس* مورد آزمایش قرار گرفت و آزمون‌های تاییدی انجام گردید.

روش بررسی

۶۰ نمونه شیر خشک نوزاد به‌طور مساوی از شش Brand مختلف در طی یک سال (۱۳۸۵) در آزمایشگاه میکروب شناسی اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو مورد آزمایش قرار گرفت. برای

نمونه‌برداری از هر نمونه، ۵۰ گرم ازمحتویات پنج بسته با یک سری ساخت پس از مخلوط کردن کامل برداشته، در شرایط استریل در یک شیشه استریل ریخته و کاملا مخلوط شد. کلیه مراحل آزمون در زیر هود لامینار حاوی فیلتر هپا انجام شد. قبل از شروع کار فضای داخلی هود با الکل ۷۰ درجه ضدعفونی گردید و سپس لامپ UV داخل هود به مدت ۲۰ دقیقه روشن ماند.سپس ۱۰ گرم شیر خشک از هر شیشه که حاوی مخلوط پنج بسته با سری ساخت یکسان بود در شرایط استریل توزین نموده و به ۹۰ میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده رینگر اضافه شد.برای تمام ۶۰ نمونه این مرحله انجام شد. پس از یکنواخت نمودن رقت به‌دست آمده، سریع در کمتر از ۱۵ دقیقه یک میلی‌لیتر از محلول فوق به‌طور مساوی بر روی چهار پلیت فنل رد آگار دارای مانیتول، زرده تخم‌مرغ و سولفات پلی‌میکسین B کشت سطحی داده شد. پس از جذب، پلیت‌ها به‌طور وارونه در دمای ۳۰°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند.در این محیط کلنی‌های پهن صورتی رنگ با هاله رسوبی مشکوک به *باسیلوس سرئوس* هستند.[۵-۷] جهت اطمینان به وجود *باسیلوس سرئوس* آزمونهای تاییدی رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسپور، تست کاتالاز (catalase test)، رشد بی‌هوازی، رشد در ۴۵°C، حساسیت به پنی‌سیلین ۱۰IU، تحرک، همولیز بتا در آگار خون‌دار با ۵٪ خون گوسفند، تست وژز- پروسکاور (voges-proskauer test) و احیای نیترات انجام شد.[۱و۶-۸] در خصوص تایید وجود *باسیلوس سرئوس* آزمونهای فوق انجام شد. در جدول ۱ باسیلوسهای مختلفی را در رابطه با این آزمونها مقایسه شده‌اند. تنها باسیلوس‌هایی که بر روی آگار خوندار با خون گوسفند همولیز بتا می‌دهند و نسبت به پنی‌سیلین ۱۰IU مقاوم می‌باشند، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس تورینجینسیس* و *باسیلوس میکوئیدیس* می‌باشند، لذا احتمال وجود سایر باسیلوس‌ها حذف می‌گردد.[۱و۷] جهت جداسازی این سه گونه باسیلوس از یکدیگر از کشت در دمای ۴۵°C می‌توان استفاده نمود. رشد *باسیلوس سرئوس* در ۴۵°C سریع بوده، *باسیلوس تورینجینسیس* در این دما بسیار به کندی رشد می‌نماید و *باسیلوس میکوئیدیس* اصلا رشد نمی‌نماید.[۸]

یافته‌ها

از میان ۶۰ نمونه شیر خشک نوزاد، ۱۱ نمونه دارای بیش از ۱۰ cfu/g بوده که از این میان چهار نمونه حاوی بیش از 10^2 cfu/g باسیلوس سرئوس بوده است. ۴۹ نمونه دیگر دارای کمتر از ۱۰ cfu/g *باسیلوس سرئوس* بودند. نتایج آزمونهای تاییدی انجام شده بر روی کلنی‌های مشکوک به قرار زیر بود: باسیل گرم مثبت اسپوردار، کاتالاز مثبت، قادر به رشد در شرایط بی‌هوازی، رشد سریع به مدت دو ساعت در فنل رد آگار در دمای ۴۵°C، مقاوم به پنی‌سیلین ۱۰IU، متحرک، بتاهمولیتیک در آگار خوندار با ۵٪ خون گوسفند، وژز- پروسکاور مثبت و احیای نیترات مثبت. تعداد کلنی‌های موجود در نمونه‌های آزمایش شده در جدول ۲ نشان داده شده است.

بحث

از آنجایی که *باسیلوس سرئوس* قادر به ایجاد مسمومیت غذایی بوده و اسپور آن به‌طور وسیعی در طبیعت پراکنده است، بررسی

جدول-۱: مقایسه آزمونهای تاییدی باسیلوس سرئوس با برخی باسیلوسهای دیگر[۱و۸]

آزمون	*باسیلوس سرئوس*	*باسیلوس آنتراسیس*	*باسیلوس مگاتریوم*	*باسیلوس میکوئیدیس*	*باسیلوس تورینجینسیس*
رشد بی‌هوازی	+	+	−	+	+
تست کاتالاز	+	+	+	+	+
تحرک	+	−	+	−	+
تست‌وژز- پروسکاور	+	+	−	+	+
احیای نیترات	+	+	v	+	+
لستیناز c	+	v	−	+	+
همولیز بتا درآگار ۵٪ خون گوسفند	+	−	−	+*	+
حساسیت به پنی‌سیلین ۱۰IU	−	+	v	−	−
رشد در ۴۵°C	سریع	کند	ندارد	ندارد	کند

(+:۹۰-۱۰۰٪ مثبت) (−:۹۰-۱۰۰٪ منفی) (v: متفاوت) (*:ضعیف)

جدول-۲: تعداد کلنی‌های *باسیلوس سرئوس* در نمونه‌های شیر خشک نوزادان

باسیلوس سرئوس cfu/g	تعداد نمونه	درصد کل از نمونه‌ها
<۱۰	۴۹	۸۱/۷
۱۰ -۱۰^{۲}	۷	۱۱/۷
>۱۰^{۲}	۴	۶/۷

وجود آن در مواد غذایی بسیار مهم می‌باشد. در ابتدا این باکتری به عنوان عامل سندرم اسهال در سال ۱۹۵۰ شناخته شد و سپس در سال ۱۹۷۱ بود که سندرم تهوع *باسیلوس سرئوس* توصیف شد. سندرم اسهال در رابطه با غذاهای گوشتی، سبزیجات، شیر و انواع سس و پودینگ گزارش شده در صورتی که فرآورده‌های نشاسته‌ای مانند برنج و ماکارونی در ایجاد سندرم تهوع دخالت دارند.[۸و۹] از میان مواد غذایی، شیر خشک نوزادان به‌علت سن بسیار کم مصرف‌کنندگان از حساسیت بیشتری برخوردار می‌باشد. اسپور *باسیلوس سرئوس* از محیط غیر بهداشتی گاوداری و از طریق پستان آلوده به خاک به‌راحتی می‌تواند شیر خام را آلوده نموده و با توجه به مقاومت حرارتی اسپور می‌تواند در شیر حرارت دیده نیز باقی بماند. علاوه بر این، هنگام بسته‌بندی شیر خشک نوزادان در کارخانجات تولیدی، در صورت تمیز نبودن محیط اطراف امکان آلودگی شیر خشک با اسپور باسیلوس سرئوس نیز وجود دارد. شیر تهیه شده از شیر خشک نوزاد حاوی ۱۰^{۲}cfu/g *باسیلوس سرئوس* با آب داغ یا گرم که در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شده در صورتی که ۱۵۰ میلی‌لیتر در یک وعده توسط نوزاد مصرف شودو همچنین شیر تهیه شده با آب جوشیده سرد پس از شش ساعت نگهداری در دمای محیط می‌تواند ایجاد بیماری نماید.[۱۰] در سال ۲۰۰۳ در یک مهد کودک در امریکا دو نوزاد پس از مصرف صبحانه غلات حاوی شیر خشک نوزادان، به استفراغ مبتلا شدند که پس از بررسیهای به‌عمل آمده آلودگی با باسیلوس سرئوس در غذای فوق تایید شد.[۱۱] از مجموع ۶۰ نمونه شیر خشک مورد آزمایش در این مطالعه، ۱۱ نمونه دارای بیش از ۱۰ cfu/g و از این میان چهار نمونه (۶/۷ درصد) حاوی بیش از ۱۰^{۲} cfu/g *باسیلوس سرئوس* بوده است. میزان *باسیلوس سرئوس* مجاز در اغلب مواد غذایی ۱۰^{۳}-۱۰^{۲} cfu/g ذکر شده و حد مجاز آن در استاندارد ملی ایران برای شیر خشک نوزادان ۱۰^{۲} cfu/g می‌باشد.[۱۲] از آنجایی که فلور میکروبی روده نوزادان کامل نبوده و امکان تکثیر این باکتری با توجه به شرایط اقلیمی متفاوت در کشور ما و تهیه و نگهداری نادرست شیر خشک وجود دارد، لازم است محدودیتهای بیشتری در این مورد اعمال شود. با توجه به اهمیت بیماری‌زایی باسیلوس سرئوس در نوزادان و احتمال افزایش سریع تعداد آن در شیر خشک پس از باز کردن در قوطی و طی استفاده‌های مکرر از آن، پیشنهاد می‌گردد حد مجاز *باسیلوس سرئوس* در استاندارد ملی ایران برای شیرخشک نوزادان، به کمتر از ۱۰ cfu/g کاهش یابد و یا طبق استاندارد ۱,۶,۱ استرالیا از هر پنج نمونه شیر خشک، بیش از یک نمونه حاوی ۱۰^{۲} cfu/g نبوده و حداقل سه نمونه از آنها نیز دارای کمتر از ۱۰ cfu/g *باسیلوس سرئوس* باشد.[۱۰] روش کشت *باسیلوس سرئوس* در استاندارد فعلی ملی ایران به‌صورت کشت سطحی ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت ۰/۱ ذکر شده که در صورت عدم مشاهده کلنی، نتیجه به صورت کمتر از ۱۰^{۲} cfu/g گزارش می‌شود.[۵] این روش قابلیت شمارش کمتر از ۱۰^{۲} cfu/g کلنی را ندارد. جهت شمارش کلنی کمتر از ۱۰^{۲} cfu/g می‌توان از روش پیشنهاد شده در این مطالعه و یا روش MPN با استفاده از ۹ لوله حاوی محیط کشت مایع انتخابی *باسیلوس سرئوس* استفاده نمود، در روش ارائه شده در این بررسی یک میلی‌لیتر از رقت ۰/۱ در سطح چندین پلیت کشت داده می شود. جهت شمارش دقیق‌تر و پخش کامل نمونه بر سطح آگار باید بیش از یک پلیت استفاده نمود، بدین منظور یک میلی‌لیتر از رقت ۰/۱ را می‌توان به حجم‌های مساوی بر روی چهار پلیت فنل رد آگار (حاوی مانیتول، زرده تخم‌مرغ و سولفات پلی میکسین B) کشت سطحی داد و پس از اتمام زمان گرمخانه‌گذاری هنگام شمارش، مجموع کلیه کلنی‌های رشد یافته در پلیت‌ها را به‌دست آورده و در عکس رقت اولیه ضرب نمود. با این روش در صورت عدم مشاهده کلنی در هیچ یک از پلیت‌ها، پاسخ به صورت کمتر از ۱۰ cfu/g گزارش می‌شود که بسیار دقیق‌تر می‌باشد. این روش قابلیت شمارش حداقل ۱۰ کلنی در گرم از نمونه را داراست. لازم است در استاندارد ملی ایران در رابطه با شناسایی *باسیلوس سرئوس* آزمون‌های تاییدی پیشنهادی در این مقاله جهت اطمینان بیشتر در تشخیص درج گردد. بدین منظور جهت تائید وجود *باسیلوس سرئوس* آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسپور، تست کاتالاز، رشد در شرایط بی‌هوازی، تست وژز- پروسکاور، تست احیای نیترات، تحرک، همولیز بتا در آگار خوندار با ۵٪ خون گوسفند، حساسیت به

پنی‌سیلین IU ۱۰ و سرعت رشد در ۴۵°C بر روی کلنی‌های مشکوک انجام شود. شایان ذکر است که از این میان، سه آزمون آخر مهمترین تستها در تشخیص باسیلوس سرئوس از سایر باسیلوس‌ها می‌باشد. با توجه به شیوع آلودگی باسیلوس سرئوس در مواد غذایی گوناگون و اهمیت وجود آن در شیر خشک نوزادان لازم است نکات بهداشتی در تهیه شیر خشک نوزاد رعایت گردد. در این خصوص فراهم نمودن محیطی بهداشتی در گاوداری، رعایت اصول استریلیزاسیون در حین شیردوشی، اجرای نکات بهداشتی پس از اعمال حرارت به شیر، رعایت شرایط مناسب در حین بسته‌بندی و تولید جهت جلوگیری از آلودگی ثانویه شیر خشک و آموزش مادران در خصوص تهیه و مصرف شیر خشک به نحو صحیح از نکات مهم پیشگیری از آلودگی باسیلوس سرئوس در شیر خشک نوزادان می‌باشد.

References

1. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 11th ed. St. Louis: Mosby: 2002.
2. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 4th ed. St. Louis: Mosby: 2002.
3. Walker TS. Annual Review of Microbiology. Philadelphia, Pa: WB Saunders: 1998.
4. Wong HC, Chang MH, Fan JY. Incidence and characterization of Bacillus cereus isolates contaminating dairy products. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54: 699-702.
۵. استاندارد ملی ایران.. شمارش و شناسایی باسیلوس سرئوس در مواد غذایی. تجدید نظر دوم، چاپ پنجم، شماره ۲۳۲٤، ۱۳۸۵.
6. ISO 7932. Microbiology of food and animal feeding stuffs: Horizontal method for the enumeration of presumptive Bacillus cereus: Colony-count technique at 30 degrees C. [Cited: 2004]; [http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=38219]. Available from: URL.
7. Nestle Laboratory Instructions: Detection & Enumeration of Bacillus cereus: 1996.
8. Joklik WK. Zinsser Microbiology. 20th ed. Norwalk, CT: Appleton & Lange: 1992.
9. Adams MR, Moss MO. Food Microbiology. 2nd ed. RSC: Cambridge: 2002.
10. The Food Standards Australia New Zealand (FSANZ). Bacillus cereus limits in infant formula (Application A 454): 2004.
11. Duc le H, Dong TC, Logan NA, Sutherland AD, Taylor J, Cutting SM. Cases of emesis associated with bacterial contamination of an infant breakfast cereal product. *Int J Food Microbiol* 2005; 102: 245-51.
۱۲. استاندارد ملی ایران. شیر خشک فالوآپ. تجدید نظر اول، چاپ اول، شماره ۲ تا ۲۲۰۲، ۱۳۷٤.

Tehran University Medical Journal; Vol. 65, No. 8, Nov 2007: 64-68

Bacillus cereus contamination in infant formula: a study in food and drug control laboratory

Rahimifard N.[1*]
Fatholahzadeh B
Pirali Hamedani M.
Noory Z
Saadati SH
Zavar M.
Pirouz B.
Asghari SH.
Khezripour M.
Saberi S.

1- Department of Food & Drug Control Laboratories- Research center labs.
2- Department of Microbiology, Tehran University of Medical Sciences.

* Corresponding author: Food & Drug Control Laboratories, Imam Khomeini Ave., No 31.
Tel: +98-361 -66400081
email: rahimif@fdo.ir

Abstract

***Background*:** *Bacillus cereus* spores distribute widely in nature and can be isolated from different kinds of foods. This bacterium can produce diarrhea and emetic enterotoxins and syndromes. As infants are known to be more susceptible to *B. cereus* infection due to their incomplete intestinal flora and fast growth of this bacterium during consumption, it is very important to investigate the presence of *B. cereus* in infant formula and possible pathogenicity of this microorganism in infants.

***Methods*:** In this study, 60 samples of infant formula were examined for the presence of *B. cereus*. From a 1/10 dilution of each sample, a total amount of 1 ml was inoculated onto four phenol red agar plates containing mannitol, egg yolk emulsion and polymyxin B sulfate. The plates were incubated at 30°C for 24 hours. Confirmation tests were then performed on suspected colonies.

***Results*:** Among the 60 samples, 11 samples had more than 10 cfu/g, four of which contained more than 102 cfu/g. The other 49 samples showed less than 10 cfu/g of *B. cereus*.

Conclusions: We suggest that for infant formula the maximum microbial limit be reduced to less than 10 cfu/g to control *B. cereus* contamination and to prevent infection in infants. For this purpose, infant formula should be tested by the method and confirmation tests used in this study. In addition, susceptibility to penicillin, ß-hemolysis and growth rate at 45ºC could also be performed.

Keywords: *Bacillus cereus*, infant, formula