Archive of SID

TUMJ مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، خرداد ۱۳۹۶، دوره ۷۵، شماره ۳، صفحه‌های ۱۷۹ تا ۱۸۶ مقاله اصیل

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 13:15 IRDT on Tuesday September 19th 2017

شناسایی سویه‌های توکسین‌زای گونه‌های گروه *باسیلوس سرئوس* در شیر خشک نوزادان با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

محمد مهدی سلطان دلال [۱و۲*]
شیرین نظام‌آبادی [۱و۳]، جلال مردانه [۴]
زهرا رجبی [۲]، ابوالفضل سیردانی [۳]

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲- مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۳- آزمایشگاه کنترل مواد غذایی و بهداشتی، معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۴- گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی.
تلفن: ۸۸۹۹۲۹۷۱ -۰۲۱
E-mail: msoltandallal@gmail.com

چکیده

دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۲۳ ویرایش: ۱۳۹۶/۰۳/۱۹ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۳۰ آنلاین: ۱۳۹۶/۰۳/۳۱

زمینه و هدف: تغییر شیوه تغذیه نوزادان در سال‌های اخیر و روند رو به رشد استفاده از شیر خشک در آن‌ها باعث اهمیت بیشتر به کیفیت شیر خشک‌های مصرفی و ارزیابی سلامت در آن‌ها شده است. هدف از این پژوهش شناسایی سویه‌های توکسین‌زای گونه‌های گروه *باسیلوس سرئوس* در شیر خشک نوزادان با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بوده است.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی که در طی ۱۲ ماه از فروردین تا اسفند سال ۱۳۹٤ در آزمایشگاه میکروب‌شناسی مواد غذایی دانشکده بهداشت صورت گرفت، از ۱۲۵ نمونه شیر خشک نوزادان پس از تهیه رقت ۰/۱ بر روی محیط اختصاصی *باسیلوس سرئوس* (Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar, MYP Agar) تلقیح شد و پس از گرمخانه‌گذاری به مدت ۲٤ ساعت در $30^{\circ}C$، کلنی‌های ظاهر شده از نظر واکنش‌های بیوشیمیایی بر اساس روش‌های استاندارد مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای تایید نهایی باسیلوس‌ها و بررسی توکسین‌های این باکتری، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن‌های انتخابی ITS تایید کننده باسیلوس و NHE مرتبط با اسهال و EM مرتبط با استفراغ انجام شد.

یافته‌ها: از ۱۲۵ نمونه شیر خشک نوزادان، ۸٤ نمونه (٦۷/۲٪) آلوده و تعداد ۱۱۰ جدایه با روش فنوتیپی، مشکوک به گروه باسیلوس به‌دست آمد. با مطالعه ژن ITS، ۹۱/۸٪ از جدایه‌ها *باسیلوس سرئوس* شناسایی شد. ۵۳/٦۳٪ این باکتری‌ها دارای ژن‌های NHE عامل سندرم اسهالی و ۷۹٪ دارای ژن EM عامل سندرم استفراغی در *باسیلوس سرئوس* بودند.

نتیجه‌گیری: داده‌های این مطالعه نشان داد که نزدیک به ۸۰٪ از جدایه‌های *باسیلوس سرئوس* دارای ژن مرتبط با استفراغ هستند و بیان‌کننده قدرت بیماری‌زایی بالای این سویه‌ها است. وجود حتی تعداد اندک این سویه‌های بیماری‌زا یعنی کمتر از میزان مجاز تعریف شده در مواد غذایی، می‌تواند مشکل‌ساز باشد.

کلمات کلیدی: مطالعه توصیفی مقطعی، شیر خشک، *باسیلوس سرئوس*، نوزادان، روش مولکولی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ویرولانس.

مقدمه

باسیلوس سرئوس باکتری گرم مثبت، هوازی-بی‌هوازی اختیاری، اسپور دار با سلول‌های رویشی طویلی (طول آن‌ها ۱ میکرون و در صورت ایجاد زنجیر ۵-۳ میکرون) می‌باشد که به‌طور گسترده‌ای در طبیعت گسترده شده است. این باکتری توانایی زندگی ساپروفیتی دارد و همچنین می‌تواند به‌عنوان یک پاتوژن فرصت طلب انسانی نیز عمل کند.[۱و۲] *باسیلوس سرئوس* به دو فرم استفراغی و اسهالی مشاهده

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 13:15 IRDT on Tuesday September 19th 2017

می‌شود. فرم اسهالی اغلب با گوشت یا غذاهای گیاهی حاوی آن پس از پخت در ارتباط است و علایم آن درد شکم، دل پیچه، مدفوع آبکی و اسهال شدید می‌باشد و بدون تب است. دوره کمون این مسمومیت ۱۶-٤ ساعت بوده و علایم ۲٤-۱۲ ساعت به طول می‌انجامد. عامل این مسمومیت انتروتوکسین موجود در غذا بوده و یا بعد از صرف غذا در روده تولید می‌شود.[۳]

فرم استفراغی در محصولات و مواد غذایی آلوده، به‌عنوان مثال، شیر، برنج، ذرت، برنج سرخ شده و ماکارونی بیشتر دیده می‌شود و علایم آن تهوع، استفراغ و به‌ندرت اسهال می‌باشد که خود محدود شونده است. این علایم ۵-۱ ساعت پس از مصرف غذای آلوده ایجاد می‌گردد و بهبودی کامل ۲٤ ساعت طول می‌کشد.[٤]

مسمومیت غذایی *باسیلوس سرئوس* در طول سال و بدون هیچ گونه توزیع جغرافیایی خاص رخ می‌دهد. در صنایع غذایی اسپورهای *باسیلوس سرئوس* به‌طور ویژه‌ای دردسرساز هستند چون اسپور می‌تواند مقاوم به پاستوریزاسیون و پرتو گاما و یا خاصیت آب‌گریزی خود به سطوح متصل شود. شیر به‌عنوان یک تغذیه جهانی برای نوزادان در حال رشد محسوب می‌شود. در طی سال‌های گذشته در شیوه تغذیه کودکان تغییراتی پدید آمده است به‌طوری که بیشتر نوزادان پیش از رسیدن به سن یک ماهگی از شیر گرفته و به روش مصنوعی تغذیه می‌کنند.[۵و٦]

سالانه نوزادان بسیاری به دلایلی از جمله سن نادرست بارداری مادر، عدم آگاهی مادر از اصول بهداشتی وغیره، نارس متولد می‌شوند. از این‌رو برای طی کردن و رسیدن مراحل تکامل و ایده‌آل در بخش مراقبت‌های ویژه نوزادان بستری می‌شوند. علاوه بر این در بخش مراقبت‌های ویژه نوزادان نوزادانی با یکسری بیماری‌ها و ناهنجاری‌ها هم بستری می‌گردند. عوامل مختلفی می‌توانند در بروز عفونت‌ها مثل ایجاد عفونت خونی نقش داشته باشد. یکی از مسایلی که به نظر می‌رسد ممکن است بتواند در بروز و یا گسترش عفونت‌های نوزادان موثر باشد، بحث تغذیه‌ی نوزادی است که مجبور به استفاده از شیر خشک هستند. نوزادان نارس یا دارای مشکلات زمینه‌ای به علت عدم بلوغ یا تکامل اندام‌هایشان از جمله دهان برای مکیدن شیر مادر، دستگاه گوارش آن‌ها برای داشتن آنزیم‌های مورد نیاز برای هضم شیر یا سایر آنزیم‌های دخیل در امر گوارش، نقص سیستم ایمنی ویا عدم داشتن شیر توسط مادر و سایر نوزادانی که بستری در بخش مراقبت‌های ویژه نوزادان هستند، از شیر خشک تغذیه می‌کنند.[۷-۹] *باسیلوس سرئوس* یکی از مهمترین عوامل بیماری‌زایی است که فرایند پاستوریزاسیون را تحمل کرده و می‌تواند در یخچال نیز رشد کند.[۱۰و۱۱]

هدف از این پژوهش شناسایی سویه‌های توکسین‌زای گونه‌های گروه *باسیلوس سرئوس* در شیر خشک نوزادان با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بود.

روش بررسی

در یک مطالعه تجربی که در طی ۱۲ ماه از فروردین تا اسفند سال ۱۳۹٤ صورت گرفت، از تعداد ۱۲۵ نمونه پودر شیر خشک نوزادان که ۸٤ نمونه آن‌ها در مطالعه پیشین مشکوک به باسیلوس بود،[۸] جهت تایید و تعیین گونه‌های توکسین‌زای باسیلوس با استفاده از روش مولکولی در آزمایشگاه میکروب‌شناسی مواد غذایی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران استفاده شد. ابتدا به منظور فعال شدن و شناسایی نهایی *باسیلوس سرئوس*، جدایه‌های مطالعه پیشین را روی محیط کشت اختصاصی *باسیلوس سرئوس* یعنی Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP Agar) برده و به مدت ٤۸-۲٤ ساعت در $30^{\circ}C$ انکوبه شدند. کلنی‌های بزرگ صورتی (عدم تخمیر مانیتول) با هاله‌ی رسوب‌دار (به‌دلیل تولید لستیناز) کلنی‌های مشکوک محسوب می‌شوند. سپس برای شناسایی باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس مایکوئیدس* و *باسیلوس تورنژنزیس* از تست‌های بیوشیمیایی شامل تست کاتالاز، رشد در شرایط بی‌هوازی، رشد در $45^{\circ}C$، تست لستیناز C، همولیز B در آگار خوندار با ۵٪ خون گوسفند، تست Methyl Red Voges Proskauer (MR-VP) Broth، حساسیت به پنی‌سیلین 10 IU و احیای نیترات استفاده شد.[۸] تمام محیط‌های به‌کار رفته از شرکت مرک (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) تهیه شده بودند.

نمونه مورد استفاده جهت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) کلنی تازه باکتری بود که بر روی محیط جامد بدون رنگ و یا محیط مایع کشت داده شده و ۱۸ تا ۲٤ ساعت بیشتر از انکوباسیون آن نگذشته باشد. سپس یک کلنی خالص از باکتری در محیط LB Agar کشت داده شد و پس از انکوباسیون، از کشت حاصله، رسوب تهیه کرده و

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 13:15 IRDT on Tuesday September 19th 2017

با استفاده از فنول کلروفرم به استخراج ژنوم پرداخته شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با Spectrophotometer (CE 7250, Cecil Ltd., Cambridge, United Kingdom Instruments) و الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. DNA استخراج شده در دمای C° ۲۰- برای استفاده بعدی فریز شد.[۱۱] Master Mix مورد استفاده جهت PCR در حجم µl ۲۵ تهیه شد. غلظت نهایی هر یک از اجزاء PCR در واکنش شامل ۱/۵ میلی‌مولار MgCl2، بافر ۱X، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۰/۲۵ میلی‌مولار پرایمر Forward، ۰/۲۵ میلی‌مولار پرایمر Reverse، ۰/۵ یونیت آنزیم Taq پلیمراز و ng ۱۰ DNA بود. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. ژن Internal transcribed spacer (ITS) برای تایید *باسیلوس سرئوس* مورد استفاده قرار گرفت. برنامه PCR شامل یک حرارت اولیه C° ۹٤ به مدت پنج دقیقه سپس ۳۵ سیکل متشکل از حرارت C° ۹٤ به مدت ۳۰ ثانیه، C° ۵۲ به مدت ۳۰ ثانیه و C° ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه بود. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Thermal Cycler (Primus 96, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) انجام گرفت. از نمونه سوش استاندارد ۱۱۷۷۸ *باسیلوس سرئوس* به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

محصول PCR در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید و پس از رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ژل داک مشاهده گردید. در ابتدا PCR گرادیان برای ژن مورد نظر در بازه دمایی Annealing ۵۰ تا C° ۶۰ گذاشته شد که در نهایت به دمای اپتیمم C° ۵۲ رسیدیم. برنامه واکنش PCR برای ژن EM شامل یک حرارت اولیه C° ۹٤ به مدت پنج دقیقه سپس ۳۵ سیکل متشکل از حرارت C° ۹٤ به مدت ۳۰ ثانیه، C° ۵۸ به مدت ۳۰ ثانیه و C° ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه بود. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت. از

جدول ۱: پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده جهت شناسایی *باسیلوس سرئوس* و فاکتورهای بیماری‌زای آن

قطعه هدف	توالی پرایمر (´3-´5)	اندازه (جفت باز)
ITS جهت شناسایی *باسیلوس سرئوس*	5′- AAT TTG TAT GGG CCT ATA GCT CAG CT-3′ 5′- TTT AAA ATA GCT TTT TGG TGG AGC CT -3′	۱۸۵
EM انتروتوکسین، سندرم استفراغی	5′- ATT ACA GGG TTA TTG GTT ACA GCA -3′ 5′- GTA TTT CTT TCC CGC TTG CCT TTT -3′	۵۷۳
NHE A همولیزین	5′- GTG CAG CAG CTG TAG GCG GT -3′ 5′- AAT CTT GCT CCA TAC TCT CTT GGA TGC T -3′	٤۷۵
NHE B	5′- GTG CAG CAG CTG TAG GCG GT -3′ 5′- ATG TTT TTC CAG CTA TCT TTC GCA AT -3′	۳۲۸
NHE C	5- GCG GAT ATT GTA AAG AAT CAA AAT GAG GT -3′ 5′- TTT CCA GCT ATC TTT CGC TGT ATG TAA AT -3′	۵۵۷

جدول ۲: دما و زمان مراحل مختلف PCR برای هرسه ژن مورد بررسی

	مرحله	زمان (ثانیه)	دما (°C)
	واسرشت	پنج دقیقه	۹۵
	واسرشت	۳۰ ثانیه	۹۵
۳۵ چرخه	اتصال پرایمر	۳۰ ثانیه	۵۲-۵۸
	طویل‌سازی	۳۰ ثانیه	۷۲
	طویل‌سازی نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲

www.SID.ir

Archive of SID

نمونـه سـوش استانـدارد ۱۱۷۷۸ *باسیلوس سرئوس* به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در ابتدا PCR گرادیانت برای ژن مورد نظر در بازه دمایی Annealing ۵۵ تا ۶۵ °C گذاشته شد که در نهایت دمای ۵۲ °C انتخاب شد (جدول ۱). برنامه واکنش PCR برای این ژن‌ها شامل یک حرارت اولیه ۹۴ °C به مدت پنج دقیقه سپس ۳۵ سیکل متشکل از حرارت ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ °C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه بود. در ابتدا PCR گرادیانت برای ژن‌های مورد نظر در بازه دمایی Annealing ۵۰ تا ۶۰ °C گذاشته شد که بهترین دما ۵۸ °C انتخاب گردید. دما و زمان‌های سه مرحله PCR در جدول ۲ آورده شد.

یافته‌ها

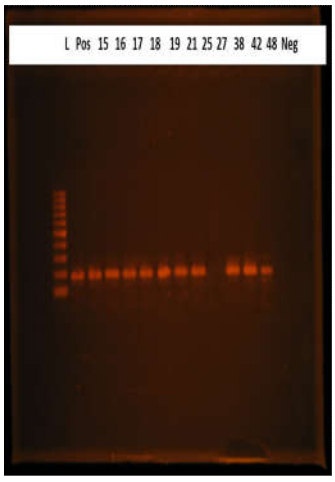
در این مطالعه از میان ۱۲۵ شیر خشک نوزاد، تعداد ۸۴ نمونه شیر خشک آلوده به باسیلوس تشخیص داده شد. از این تعداد شیر خشک آلوده، با استفاده از روش‌های فنوتیپی، ۱۱۰ جدایه گروه باسیلوس شناسایی شد، که شامل ۹۷ جدایه *باسیلوس سرئوس* (۸۸/۲٪)، پنج جدایه *باسیلوس میکوئیدس* (۴/۵٪) و سه جدایه *باسیلوس مگاتریوم* (۲/۸٪) و پنج جدایه هم نامشخص بود. بر روی همه نمونه‌های جداسازی شده PCR انجام شد. نتایج PCR نشـان داد که از ۱۱۰ ایزوله فنوتیپی، ۱۰۱ ایزوله یعنی حدود ۹۱/۸۱٪ با استفاده از ژن ITS متعلق به گروه *باسیلوس سرئوس* بودند (شکل ۱). ژن‌های کمپلکس NHE که شامل nheA, nheB, nheC می‌شوند، از عوامل ایجادکننده انتروتوکسین عامل سندرم اسهالی می‌باشند. در مطالعه حاضر میزان شیوع این ژن ها در شیر خشک‌های مصرفی در بخش مراقبت‌های ویژه‌ی نوزادان ۵۳/۶۳٪ تعیین گردید. در این مطالعه ۵۹ نمونه از مجموع ۱۱۰ نمونه‌ی آلوده، واجد ژن‌های این کمپلکس بودند.

ژن EM کدکننده انتروتوکسین (سرئولید) عامل سندرم استفراغی ناشی از *باسیلوس سرئوس* می‌باشد. میزان شیوع آن در این ۸۷ ایزوله (۷۹٪) بود.

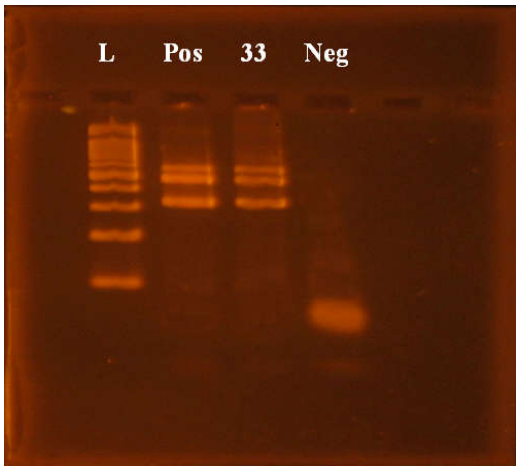
بحث

در مطالعه حاضر که بر روی آلودگی شیر خشک‌های مصرفی به باکتری *باسیلوس سرئوس* و بررسی ایزوله‌های توکسین‌زای این باکتری در شیر خشک صورت گرفت، میزان آلودگی به *باسیلوس سرئوس* ۶۷/۲٪ مشاهده گردید. همچنین در مطالعه حاضر میزان شیوع ژن‌های NHE، ۵۳/۶۳٪ و ژن EM ۷۹٪ بود.

Rahimifard و همکاران در سال ۱۳۸۶، *باسیلـوس سرئوس* را در



شکل ۱: نتایج PCR بر روی ژن ITS *باسیلوس سرئوس* با سایز 185bp. Line M: سایز مارکر 100bp، Line 1: کنترل مثبت، Line 14: کنترل منفی



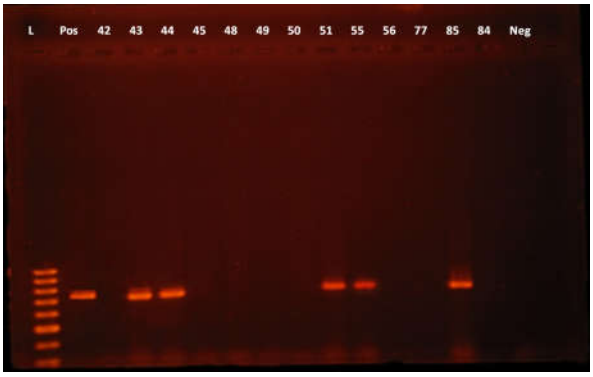
شکل ۲: نتایج PCR بر روی ژن NHE *باسیلوس سرئوس* با سایز 475bp, 328bp, 557bp. Line M: سایز مارکر 100bp، Line 3: کنترل مثبت، Line 5: کنترل منفی

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 13:15 IRDT on Tuesday September 19th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 13:15 IRDT on Tuesday September 19th 2017



شکل ۳: نتایج PCR بر روی ژن EM *باسیلوس سرئوس* با سایز 635bp. Line M: سایز مارکر 100bp، Line 1: کنترل مثبت، Line 14: کنترل منفی

شیر خشک نوزادان بررسی کردند و از ٦٠ نمونه‌ی بررسی شده، ١٥ نمونه بالاتر از حد مجاز معرفی گردید.[١٢] برای آماده‌سازی نمونه‌ها از g ١٠ نمونه در ml ٩٠ رینگر استفاده کردند و سپس با استفاده از محیط Phenol Red Mannitol Agar به بررسی وجود *باسیلوس سرئوس* پرداختند. این در حالی است که در مطالعه ما از روش استاندارد (g ٢٥ در ml ٢٢٥) برای آماده‌سازی شیر خشک‌ها استفاده شد و برای کشت، محیط اختصاصی *باسیلوس سرئوس* (MYP) به کار گرفته شد. در مطالعه دیگری Rahimifard و همکارانش بر روی ٢٠٠ غذای کودک بررسی انجام دادند که ٨٤ نمونه از آن (٤٢٪) آلودگی را نشان دادند و میزان شیوع ژن عامل توکسین استفراغی را ٦١/٩٪ و ژن‌های NHE را ٥١/١٩٪ اعلام کردند.[١٣] درحالی‌که در مطالعه ما میزان شیوع ژن EM و NHE به‌ترتیب ٧٩٪ و ٥٣/٦٣٪ بود و از مشابهت بالایی برخوردار بود.

Moradi-Khatoonabadi و همکارانش در مطالعه‌ای که بر روی شیر خام دریافتی کارخانه‌های تولیدکننده‌ی پنیرهای فراپالایش در گرگان انجام شد، نشان دادند فرایند پاستوریزاسیون در حذف *باسیلوس سرئوس* چندان موفق نبوده و این باکتری در محصولات لبنی پاستوریزه هم وجود دارد.[١٤] همچنین Ankolekar و همکاران ٨٣ *باسیلوس سرئوس* را از مجموع ٩٤ نمونه (٨٨/٣٪) *باسیلوس سرئوس* را از برنج جداسازی کردند که ٨٩٪ موارد جدا شده شامل ژن NHE بود.[١٥] همچنین Gitahi و همکارانش در تولیدات شیر و پنیر و برنج پخته وجود کمپلکس NHE را مطالعه کردند و از ٥١ نمونه *باسیلوس سرئوس* جدا شده ٢٢٪ آلوده گزارش شد.[١٦] در پژوهش Zhou و همکارانش وجود باکتری *باسیلوس سرئوس* در ٧١/٤٪ از شیرهای پاستوریزه اعلام شد که از این میزان آلودگی، ٧١/١٪ دارای ژن‌های NHE بودند.[١٧]

با توجه به این که سویا، شیر و افزودنی‌ها از مواد مهم تشکیل دهنده‌ی شیر خشک می‌باشند، تایید وجود *باسیلوس سرئوس* در آن‌ها می‌تواند دلیل محکمی برای آلودگی شیر خشک‌ها به این باکتری باشد.

Di Pinto و همکارانش از مجموع ٦٠ نمونه شیر خشک، ١١ نمونه را آلوده به باسیلوس تشخیص دادند.[١٨] در این مطاله برای ساخت رقت ٠/١ از g ٢٠ نمونه در ml ١٨٠ محیط غنی کننده MRD استفاده کردند و سپس از محیط کشت Polymyxin pyruvate egg-yolk mannitol-bromothymol blue agar (PEMBA) استفاده شد. همچنین برای انجام تست‌های بیوشیمیایی از API kit (BioMerieux, Lyon, France) استفاده کردند. این درصد متفاوت از حضور *باسیلوس سرئوس* در این مطالعه و مطالعه ما می‌تواند به‌علت کیفیت شیرهای خام مورد استفاده، متفاوت بودن شرایط اقلیمی و نظارت بالا بر روی کارخانه‌های تولیدی باشد. همچنین در این مطالعه در بین ایزوله‌های جدا شده *باسیلوس میکوئیدس*، *باسیلوس لیکنی فرمیس* و *باسیلوس مگاتریوم* هم همانند مطالعه ما دیده شد.

Logan در بررسی خود، *باسیلوس میکوئیدس*، *باسیلوس مگاتریوم* و *باسیلوس لیکنی فرمیس* را نیز از عوامل تولیدکننده‌ی توکسین‌های اسهالی و استفراغی در بیماری‌های منطقه از غذا معرفی کرد و خواستار توجه بیشتر روی این باکتری‌ها شد. Logan توانایی تولید توکسین‌های مشابه توسط این باکتری‌ها را نیز تایید کرد.[١٩]

Reyers و همکارانش نیز با بررسی ٣٨١ نمونه از انواع غذای کودکان مصرفی در برنامه تغذیه‌ای مدارس، میزان شیوع *باسیلوس سرئوس* در غذاهای کودکان بر پایه برنج و شیر ٦٢/٥٪ اعلام نمود که ٢٩/٨٪ آن‌ها انتروتوکسین nhe تولید کرده بودند.[١٠]

در مطالعه حاضر نیز میزان حضور *باسیلوس سرئوس* ٦٧/٤٪ بود که مشابه مطالعه‌ی Reyers در شیلی بوده است که در آن، همانند مطالعه حاضر از محیط MYP برای شناسایی *باسیلوس سرئوس*

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده شده است. همچنین میزان شیوع انتروتوکسین NHE در این مطالعه ۵۳/٦ بود که این تفاوت ممکن است به علت تفاوت در مواد پایه در تولید شیر خشک و غذای کودکان باشد.

Tunio و همکارانش ۲۱ نمونه‌ی شیر خشک از لحاظ آلودگی میکروبی مورد بررسی قرار دادند که پنج نمونه آلوده به *باسیلوس سرئوس* و نمونه‌های دیگر آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروباکتر ساکازاکی* بود.[۲۰] پژوهش Deeb نیز ۵٦/۹٪ آلودگی را در شیر خشک نشان داد[۲۱] که همانند مطالعه‌ی ما از g ۲۵ نمونه در ml ۲۲۵ آب پپتونه استفاده شده بود و همچنین دو ایزوله *باسیلوس میکوئیدس* و ۵ ایزوله *باسیلوس لیکنی فرمیس* و ۱ ایزوله *باسیلوس سوبتیلیس* جداسازی شده بود که با پنج نمونه *باسیلوس میکوئیدس* در مطالعه‌ی حاضر همخوانی داشت.

در مطالعه Naranjo و همکاران طی یک مسمومیت غذایی، یک مرد ۲۰ ساله پس از مصرف ماکارونی آلوده به *باسیلوس سرئوس*، درگذشت. در آن مطالعه سطح بسیار بالایی از سرئولید (Cereulide) به میزان µg/g ۱٤/۸ در ماکارونی یافت شد.[۲۲] 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. انواعی از پاتوژن‌های فرصت‌طلب می‌توانند از مسیرهای مختلف از جمله مواد غذایی به جامعه انسانی و محیط‌های بیمارستانی راه یافته و فاکتورهای ویرولانس و مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی را از دیگر باکتری‌های بالقوه مقاوم و بیماریزا موجود در محیط‌های بیمارستانی کسب کنند.[۲۵-۲۳] تغییر شیوه تغذیه در نوزادان در سال‌های اخیر و روند رو به رشد استفاده از شیر خشک به‌عنوان تنها منبع مغذی در طول دوران رشد در کودکان باعث اهمیت و توجه بیشتر به کیفیت شیر خشک‌های مصرفی و ارزیابی سلامت در آن‌ها شده است. از این رو مطالعات گسترده بر روی نمونه‌های شیر خشک مصرفی نوزادان به ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه نوزادان که نوزادان بستری در این بخش معمولاً دارای فاکتورهای خطر متعدد (ضعف ایمنی، کاهش وزن، تولد پیش از موعد، بیماری‌های زمینه‌ای تضعیف‌کننده سیستم ایمنی) می‌باشند، از نظر ارگانیسم‌های پاتوژن فرصت‌طلب دارای اهمیت زیادی است و می‌تواند به عنوان موضوعی مهم در دستور کار بررسی‌کنندگان آلودگی‌های پودرهای شیر خشک و همچنین دیگر مواد غذایی قرار گیرد.[۲۱]

اجرای دقیق‌تر برنامه‌های کنترل کیفی و ارائه پروتکل‌های جدیدتر در جهت بررسی مواد غذایی مختلف از جمله شیر خشک از نظر آلودگی به جدایه‌های دارای ژن بیماری‌زا بسیار حایز اهمیت است. با توجه به فرصت طلب بودن *باسیلوس سرئوس* و همچنین گسترش استفاده از شیر خشک در جوامع امروزی، لازم است توجه ویژه‌ای به کنترل کیفیت شیر خشک‌های وارداتی و نظارت دقیق بر کارخانه‌های تولیدی این محصول، صورت گیرد.

داده‌های این مطالعه نشان داد که نزدیک به ۸۰٪ از جدایه‌های *باسیلوس سرئوس* دارای ژن مرتبط با استفراغ هستند در نتیجه بیان‌کننده قدرت بیماریزایی بالای این سویه‌ها است. وجود حتی تعداد اندک این سویه‌های بیماری‌زا یعنی کمتر از میزان مجاز تعریف شده در مواد غذایی، می تواند مشکل‌ساز باشد.

سپاسگزاری: این مقاله نتیجه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۲۱۹۰۸ می‌باشد.

References

1. 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.
2. Callegan MC, Booth MC, Jett BD, Gilmore MS. Pathogenesis of gram-positive bacterial endophthalmitis. *Infect Immun* 1999;67(7):3348-56.
3. Rosenquist H, Smidt L, Andersen SR, Jensen GB, Wilcks A. Occurrence and significance of Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis in ready-to-eat food. *FEMS Microbiol Lett* 2005;250(1):129-36.
4. Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE. From soil to gut: Bacillus cereus and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev* 2008;32(4):579-606.
5. Askarizade N, Pourzakariya Z, Najafpoor A. Fluoride content of packaged milk and infant formulas in Tehran. *Res Dent Sci* 2014;11(2):108-11.
6. Mullane NR, Drudy D, Whyte P, O'mahony M, Scannell AGM, Wall PG, et al. Enterobacter sakazakii: biological properties and significance in dried infant milk formula (IMF) powder. *Int J Dairy Tech* 2006;59(2):102-11.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 13:15 IRDT on Tuesday September 19th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 13:15 IRDT on Tuesday September 19th 2017

7. Mardaneh J, Soltan Dallal MM. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of Pantoea (Enterobacter) agglomerans isolated from consumed powdered infant formula milk (PIF) in NICU ward: First report from Iran. *Iran J Microbiol* 2013;5(3):263-267.
8. Soltan Dallal MM, Nezamabadi S, Sharifi Yazdi MK, Mardaneh J, Taheripoor M. To determine the frequency of Bacillus cereus in powdered milk infant formula consuming in Neonatal Intensive Care Unit (NICU) in Tehran Hospitals in 2013-14. *Iran South Med J* 2017;19(6):982-8.
9. Reyes JE, Bastías JM, Gutiérrez MR, Rodríguez Mde L. Prevalence of Bacillus cereus in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. *Food Microbiol* 2007;24(1):1-6.
10. Wong HC, Chang M, Fan J. Incidence and characterization of Bacillus cereus isolates contaminating dairy products. *Appl Environ Microbiol* 1988;54(3):699-702.
11. Ombui JN, Gitahi JN, Gicheru MM. Direct detection of Bacillus cereus enterotoxin genes in food by multiplex polymerase chain reaction. *Int J Integr Biol* 2008;2(3):172-81.
12. Rahimifard N, Fatholahzadeh B, Noory Z, Saadati S, Zavar M, Pirouz B, et al. Bacillus cereus contamination in infant formula: a study in food and drug control laboratory. *Tehran Univ Med J* 2007;65(8):64-8.
13. Rahimi E, Abdos F, Momtaz H, Torki Baghbadorani Z, Jalali M. Bacillus cereus in infant Foods: Prevalence study and distribution of enterotoxigenic virulence factors in Isfahan Province, Iran. *Sci World J* 2013; 2013:292571.
14. Moradi-Khatoonabadi Z, Maghsoudlou Y, Ezzatpanah H, Khomeiri M, Aminafshar M. Occurrence of Bacillus cereus in raw milk receiving from UF-Feta Cheese Plants. *Iranian J Health Environ* 2013;6(4):545-57.
15. 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.
16. Gitahi NJ, Ombui JN, Nduati DW, Gicheru MM. Genetic characterization of food borne Bacillus cereus strains from milk, cheese and rice by multiplex PCR assay. *Int J Integr Biol* 2009;5(2):82-6.
17. 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.
18. Di Pinto A, Bonerba E, Bozzo G, Ceci E, Terio V, Tantillo G. Occurence of potentially enterotoxigenic Bacillus cereus in infant milk powder. *Eur Food Res Techno* 2013;237(2):275-9.
19. Logan NA. Bacillus and relatives in foodborne illness. *J Appl Microbiol* 2012;112(3):417-29.
20. Tunio SA, Bano S, Jatt AN, Mal S, Naeem M, Naeem A, et al. Evaluation of Bacterial Contamination of Powdered Food Products, Pakistan. *Sindeh Univ Res J* 2013;45(1):53-8.
21. Deeb A, Al-Hawary I, Shahine D. Bacteriological investigation on milk powder in the Egyptian market with emphasis on its safety. *Glob Vet* 2010;4(5):424-33.
22. Naranjo M, Denayer S, Botteldoorn N, Delbrassinne L, Veys J, Waegenaere J, et al. Sudden death of a young adult associated with Bacillus cereus food poisoning. *J Clin Microbiol* 2011;49(12):4379-81.
23. Mardaneh J, Soltan Dallal MM. Isolation and Identification Enterobacter asburiae from Consumed Powdered Infant Formula Milk (PIF) in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU). *Acta Med Iran* 2016;54(1):39-43.
24. Anvarinejad M, Amin Shahidi M, Pouladfar GR, Dehyadegari MA, Mardaneh J. Campylobacter jejuni bacteremia in a patient with acute lymphocytic leukemia. *Iran Red Crescent Med J* 2016;18(6):e23992.
25. Mardaneh J, Soltan Dallal MM, Taheripoor M, Rajabi Z. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility pattern of Tatumella ptyseos strains isolated from powdered infant formula milk consumed in Neonatal Intensive Care Unit: First Report from Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2014;7(6):e10608.

www.SID.ir

Archive of SID

TUMJ Tehran University Medical Journal, June 2017; Vol. 75, No. 3: 179-186 Original Article

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 13:15 IRDT on Tuesday September 19th 2017

Detection of toxigenic bacillus cereus strains in powdered infant formula (PIF) milk by PCR assay

Mohammad Mehdi Soltan Dallal Ph.D.[1,2*]
Shirin Nezamabadi M.Sc.[1,3]
Jalal Mardaneh Ph.D.[4]
Zahra Rajabi M.Sc.[2]
Abolfazl Sirdani M.Sc.[3]

1- Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Food Microbiology Research Center, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Food and Hygiene Control Laboratory, Deputy of Food and Drug, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4- Department of Microbiology, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran.

*Corresponding author: Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Keshavarz Blvd., Qods St., Poorsina St., Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 88992971
E-mail: msoltandallal@gmail.com

Abstract

Received: 13 Dec. 2016 Revised: 08 Jun. 2017 Accepted: 20 Jun. 2017 Available online: 21 Jun. 2017

Background: In recent years, use of powdered infant formula (PIF) milk for neonates feed is increasing; therefore, the quality control (QC) of PIF products is very important. The aim of present study was detection of toxigenic Bacillus cereus species in PIF milk using PCR assay.

Methods: The cross-sectional study was carried out on 125 samples of powdered infant formula milk (PIF) purchased between March 2015 and April 2016 in Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Briefly, 0.1 dilutions were prepared and inoculated on Bacillus cereus selective media (MYP) and incubated at 30 °C for 24 hours. The suspicious colonies were verified using biochemical tests based on standard methods. Final confirmation of studied isolates was carried out by ITS gene detection using polymerase chain reaction (PCR) assay. Presence of nonhemolytic enterotoxin (NHE) (linked to diarrhoea syndrome) and emetic toxin (EM) (linked to emetic syndrome) virulence genes were investigated using polymerase chain reaction assay.

Results: In this study, of 125 PIF samples, 84 (67.2%) were contaminated. Of various recovered bacteria from these samples, 110 bacterial isolates were suspected to be Bacillus spp. using phenotypic methods. The ITS PCR results showed that 91.8% of the isolates were B. cereus. Respectively, 53.63 and 79% of B. cereus isolates possessed NHE and EM virulence genes.

Conclusion: Our data revealed that near 80% of Bacillus cereus isolates have emetic toxin (EM) gene, as result virulence potency of this isolates is very high. However, the low number of this organisms in foods is very important and food safety protocols for these opportunistic toxigenic bacteria should be revised. Since the pasteurization process is ineffective on B. cereus spores; therefore, spores can remain in PIF milk and the vegetative bacterial cells can cause food poisoning in neonates. Therefore, modification of foods quality control protocols is essential in order to identify virulence genes in this bacterium.

Keywords: bacillus cereus, cross-sectional studies, infants, infant formula, molecular method, polymerase chain reaction, virulence.

www.SID.ir