بررسی میزان شیوع و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری باسیلوس سرئوس در شیرخشک نوزاد و موادغذایی حاوی شیرخشک

بیگم امیدی [1] ، شیلا صفائیان [2*] ، ناهید رحیمی فرد [1,2] ، رضوان موسوی ندوشن [1] ، بابک پوراکبری [3,1]

۱- گروه صنایع غذایی واحد تهران شمال ، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲-دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
۳- دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

***نویسنده مسئول:** *shila2462462@yahoo.co.in*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۰۱

چکیده

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی شیوع و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *باسیلوس سرئوس* در بستنی، کیک، پنیر و شیرخشک نوزاد انجام گرفت. بدین‌منظور ۶۰۰ نمونه از مراکز فروش مواد غذایی در شهر تهران تهیه و به آزمایشگاه کنترل کیفی دانشکده دامپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل شد و بر روی محیط کشت اختصاصی *باسیلوس سرئوس*، MYP که حاوی مکمل پلی‌میکسین‌بی و زرده تخم‌مرغ بود، کشت داده شد. سپس از کلونی‌های صورتی‌رنگ تشکیل شده، رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز انجام شد و حساسیت باکتری‌های جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، پنی‌سیلین، وانکومایسین، سفازولین، متی‌سیلین، سفکسیم، سولفامتوکسازول تری‌متوپریم، کلرامفنیکل، سفپیم و تتراسایکلین براساس روش انتشار دیسک ارزیابی شدند. در هیچ یک از نمونه‌های کیک، پنیر و بستنی آلودگی به *باسیلوس سرئوس* مشاهده نشد. اما از ۱۵۰ نمونه شیرخشک نوزاد، ۳۰ نمونه آلوده به *باسیلوس سرئوس* (۱۸ نمونه دارای کمتر از ۱۰ CFU/g ، ۷ نمونه ۱۰-۱۰^{۲} CFU/g و ۵ نمونه بیشتر از ۱۰^{۲} CFU/g) بودند. نتایج آنتی‌بیوگرام نشان داد که *باسیلوس سرئوس*های جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های وانکومایسین (۷/۷۶ درصد)، تتراسایکلین (۷۰ درصد) و کلرامفنیکل (۶۳/۳ درصد) بیشترین حساسیت و به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۱۰۰ درصد)، سفکسیم (۱۰۰ درصد) و آمپی‌سیلین (۹۶/۷ درصد) بیشترین مقاومت را داشتند. نتایج کلی حاکی از شیوع قابل توجه *باسیلوس سرئوس* در شیر خشک‌های مورد آزمایش بود، که با توجه به روند رو به رشد استفاده از شیر خشک و اهمیت بیشتر به کیفیت و ارزیابی سلامت در شیر خشک‌های مصرفی، باید بررسی آلودگی و رویکردهای پیشگیرانه بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

کلید واژه ها: شیرخشک نوزاد، مواد غذایی، *باسیلوس سرئوس*، آنتی بیوتیک.

مقدمه

شیر مادر به دلیل فواید زیادی از قبیل محافظت در برابر عفونت، کاهش فشار خون، کاهش کلسترول، کاهش خطر دیابت و چاقی که دارد بهترین نوع تغذیه برای نوزادان محسوب می‌شود. بعد از شیر مادر، شیرخشک، منبع اصلی تغذیه برای نوزادان قبل از هضم غذاهای دیگر است (Ghazaei, 2021؛ Sadek et al., 2018). نوزادان و کودکان خردسال به‌طور عمده‌ای در معرض ابتلا به بیماری‌های منتقله از غذا هستند زیرا سیستم ایمنی ضعیفی دارند و در معرض مشکلات و اختلالات گوارشی هستند که عمدتاً توسط عوامل بیماری‌زا ایجاد می‌شوند (Ranjbar and Shahreza, 2017).

سازمان بهداشت جهانی[1] توصیه کرده است که نوزادان در شش ماه اول زندگی صرفاً با شیر مادر تغذیه شوند (Barrio *et al*., 2015; Ghazaei, 2021). شیرخشک نوزاد، یک ماده غذایی برپایه شیر، متناسب با ارزش تغذیه‌ای شیر مادر است که برای نوزادان با نقص سیستم ایمنی و مواردی که امکان تغذیه با شیر مادر وجود ندارد،

[1] World Health Organisation (WHO)

مورد استفاده قرار می‌گیرد (Askarizade et al., 2014). مطابق گزارش سازمان جهانی غذا و دارو[1] ۴۰، ۵۰ و بیشتر از ۷۵ درصد نوزادان به‌ترتیب در ۳، ۶ و ۱۲ ماهگی با شیر خشک نوزاد تغذیه می‌شوند (Barrio et al., 2015؛ ایزدی، ۱۳۹۵).

یکی از مسایلی که به نظر می‌رسد ممکن است بتواند در بروز و یا گسترش عفونت‌های نوزادان موثر باشد، بحث تغذیه نوزادی است که مجبور به استفاده از شیر خشک هستند. نوزادان نارس یا دارای مشکلات زمینه‌ای به علت عدم تکامل اندام‌هایشان از جمله دهان برای مکیدن شیر مادر، دستگاه گوارش آنها برای داشتن آنزیم‌های موردنیاز برای هضم شیر یا سایر آنزیم‌های دخیل در امر گوارش، نقص سیستم ایمنی و یا عدم داشتن شیر توسط مادر و سایر نوزادانی که بستری در بخش مراقبت‌های ویژه نوزادان هستند، از شیر خشک تغذیه می‌کنند (Mardaneh *et al.*, 2013; Soltan Dallal *et al.*, 2017). با توجه به این که امکان آلودگی شیر خشک نوزاد به پاتوژن‌های فرصت طلب همیشه وجود دارد، شیوع *باسیلوس سرئوس* در شیر و فرآورده‌های بر پایه شیر به‌ویژه شیر خشک نوزاد زیاد است. باکتری مذکور علاوه بر ایجاد مسمومیت غذایی، عفونت در نوزادان را نیز به همراه دارد. از این‌رو شناسایی دقیق این باکتری از اهمیت زیادی برخوردار است (ایزدی، ۱۳۹۵).

باسیلوس سرئوس یکی از مهمترین عوامل بیماریزایی است که فرایند پاستوریزاسیون را تحمل کرده و می‌تواند در یخچال نیز رشد کند (Ombui et al., 2008). همچنین توانایی زندگی ساپروفیتی دارد و به‌عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب انسانی نیز عمل می‌کند. Owusu-Kwarteng et al., 2017؛ Park et al., 2020؛ Fiedler et al., 2019; Ghazaei, 2021). شیرخام به ندرت در صنعت غذا استفاده می‌شود. استفاده از شیر خشک به دلایلی نظیر سهولت جابجایی، حمل و نقل و فرآوری در فرمولاسیون‌های مواد غذایی ارجحیت دارد (رشیدی و همکاران، ۱۴۰۰؛ پورسید و همکاران، ۱۳۹۶). آمینواسیدهای غلات توسط آمینواسیدهای شیر تکمیل می‌شوند چرا که غلات از نظر لیزین و تریپتوفان دارای محدودیت می‌باشند درحالی که شیر غنی از این دو اسید آمینه است (پورسید و همکاران، ۱۳۹۶). مطالعات انجام گرفته حاکی از بهبود خواص فیزیکوشیمیایی، رئولوژیکی و بافتی محصولات صنایع غذایی تحت تأثیر کاربرد شیر خشک است (پایدار و همکاران.، ۱۳۹۴؛ پورسید و همکاران.، ۱۳۹۶؛ مجذوبی و همکاران.، ۱۳۹۳؛ شهیدی نوقابی و همکاران.، ۱۳۹۵).

مسمومیت غذایی *باسیلوس سرئوس* در طول سال و بدون هیچ‌گونه توزیع جغرافیایی خاصی رخ می‌دهد (سلطان دلال و همکاران، ۱۳۹۶). همچنین عدم استریل بودن پودر شیرخشک، زمینه را برای رشد میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌نماید. از جمله پاتوژن‌هایی که سبب آلودگی شیرخشک و ایجاد عوارضی همچون سپسیس، باکتریمی و مننژیت می‌شوند می‌توان به *باسیلوس سرئوس* اشاره نمود که از اهمیت زیادی برخوردار است (Fiedler et al., 2019; Liu et al., 2015; Mills et al., 2022). مهمترین بیماری‌های منتقله از طریق غذا به دلیل تولید انتروتوکسین‌ها (سم اسهالی) و توکسین پپتید سنتناز غیر ریبوزومی[2](سم استفراغی یا سرئولید) است (Fiedler et al., 2019). بنابراین این باکتری مؤلد انتروتوکسین‌های اسهال و تهوع بوده و قادر به ایجاد سندرم اسهال و تهوع می‌باشد (Rahimifard et al., 2017).

آنتی‌بیوتیک‌ها مواد هستند که توانایی جلوگیری از رشد یا از بین بردن باکتری‌ها را دارند. مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها با دز بالا و در کوتاه مدت اثرات درمانی دارد. مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و عدم رعایت نکات ضروری در استفاده از آن‌ها در دامداری‌ها و مرغداری و باقیمانده آن در گوشت، شیر و سایر مواد غذایی با منشأ دامی سبب ایجاد خطرهای قابل توجه برای مصرف‌کنندگان خواهد شد که از مهمترین آن‌ها می‌توان به: ایجاد مقاومت دارویی میکروارگانیسم‌های پاتوژن به آنتی‌بیوتیک‌ها، ایجاد سروتیپ‌های جدید با پاتوژنسیته متفاوت، ایجاد انواع آلرژی در افراد حساس، بخصوص در مورد باقیمانده‌های پنی‌سیلین در شیر، ایجاد مشکلات در فرایندهای تخمیری در تولید فرآورده‌های لبنی و ایجاد مشکلات تشخیصی در آزمایشگاه‌های طبی و مواد غذایی در تعیین عوامل باکتریایی مسبب ایجادکننده بیماری، اشاره نمود. علت اصلی پیدایش مقاومت دارویی، مصرف نامناسب و زیاد از

[1]Food and Agriculture Organization (FAO)

[2]Non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) toxin

حد آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد و همچنین استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی در حیوان باعث بروز مقاومت‌های میکروبی در انسان می‌شود (شیرعلی، ۱۳۹۸). به‌طور کلی، باکتری‌ها با روش‌های گوناگونی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهند. این مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از چالش‌های عمده سازمان بهداشت جهانی در قرن بیست و یکم است (Fiedler et al., 2019). متداول‌ترین و مهمترین این روش‌ها تولید آنزیم‌های غیرفعال‌کننده آنتی‌بیوتیک‌هاست و از جمله مهمترین این آنزیم‌ها، آنزیم بتالاکتاماز است (جلال‌پور و همکاران، ۱۳۸۹؛ Paterson and Bonomo, 2005). بتالاکتامازها، آنزیم‌های تجزیه‌کننده آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام می‌باشند. این آنزیم‌ها به دنبال مصرف آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام ظهور می‌یابند. پنی‌سیلیناز، اولین بتالاکتامازی است که شناسایی شد (جلال‌پور و همکاران، ۱۳۸۹؛ Agrawal et al., 2008). به طور کلی عبارتند از بتالاکتامازهایی که قادر به هیدرولیز و غیرفعال کردن آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام رایج از قبیل پنی‌سیلین، اکسی آمینوسفالوسپورین‌ها و سفالوسپورین‌های نسل یک، دو، سه، آزترئونام، منوباکتام، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفتازیدیم و حتی کاربانم‌ها می‌باشد (قضائی ،۱۳۹۷). جعفری کزج (۱۳۹۸) پس از مطالعه فراوانی آلودگی به *باسیلوس سرئوس* در شیرینی خامه‌ای تولید شده در شهرستان زابل و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، گزارش کرد که ۷۱/۵ درصد شیرینی‌های مورد آزمایش، آلوده به *باسیلوس سرئوس* بودند که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۱۰۰ درصد) و پنی‌سیلین (۱۰۰ درصد) مقاوم و نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین بیشترین حساسیت (۹۰/۴ درصد) را داشت. لذا تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *باسیلوس سرئوس* جدا شده از مواد غذایی به لحاظ بهداشت عمومی حائز اهمیت است. چرا که هنوز به‌خوبی مورد بررسی قرار نگرفته که تا چه حد سویه‌های گروه *باسیلوس سرئوس* می‌توانند به‌عنوان منبعی برای انتقال ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در زنجیره غذایی باشند (Fiedler et al., 2019). از این‌رو در این مطالعه به بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *باسیلوس سرئوس* در شیرخشک نوزاد مورد استفاده در تغذیه نوزادان و مواد غذایی حاوی شیرخشک (پنیر، کیک و بستنی) پرداخته شد.

مواد و روش کار

تهیه نمونه‌ها

۶۰۰ نمونه از فروشگاه‌های سطح شهر تهران شامل بستنی وانیلی، کیک اسفنجی بدون طعم و پنیر لاکتیکی و شیرخشک نوزاد (از داروخانه های سطح شهر) با برند و سری ساخت یکسان (از هر کدام ۱۵۰ نمونه) جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد.

کشت و شناسایی *باسیلوس سرئوس*

از هر نمونه، ۵۰ گرم از محتویات پنج بسته با یک‌سری ساخت پس از مخلوط کردن کامل برداشته، در شرایط استریل در یک شیشه استریل ریخته و کاملاً مخلوط شد. ۱۰ گرم شیرخشک از هر شیشه که حاوی مخلوط ۵ بسته با سری ساخت یکسان بود در شرایط استریل توزین و به ۹۰ میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده رینگر اضافه شد. پس از یکنواخت نمودن رقت بدست آمده، 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 درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. در این محیط کلنی‌های پهن صورتی رنگ با هاله رسوبی مشکوک به *باسیلوس سرئوس* هستند. جهت اطمینان به وجود *باسیلوس سرئوس* آزمون‌های تأییدی رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسپور، تست کاتالاز، رشد بی‌هوازی، رشد در ۴۵ درجه سانتی‌گراد، حساسیت به پنی‌سیلین، تحرک، همولیز بتا در آگار خون‌دار با ۵ درصد خون گوسفند، تست وژز-پروسکاور و احیای نیترات انجام شد (ISO 7932, 2004; Rahimifard, 2007). در خصوص تأیید وجود *باسیلوس سرئوس* آزمون‌های فوق انجام شد. تنها باسیلوس‌هایی که بر روی آگار خون‌دار با خون گوسفند همولیز بتا می‌دهند و نسبت به پنی‌سیلین مقاوم می‌باشند، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس تورینجینسیس* و *باسیلوس میکوئیدیس* می‌باشند، لذا احتمال وجود سایر باسیلوس‌ها حذف می‌گردد. جهت جداسازی این گونه باسیلوس از یکدیگر از کشت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. رشد *باسیلوس سرئوس* در دمای

۴۵ درجه سانتی‌گراد سریع بوده، *باسیلوس تورینجینسیس* در این دما بسیار به‌کندی رشد می‌نماید و *باسیلوس میکوئدیس* اصلاً رشد نمی‌نماید (Rahimifard, 2016).

تشخیص *باسیلوس سرئوس*‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک

حساسیت آنتی‌بیوتیکی *باسیلوس سرئوس* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی سیلین، پنی سیلین، وانکومایسین، سفازولین، متی سیلین، سفکسیم، سولفامتوکسازول تری متوپریم یا کوتریموکسازول، کلرامفنیکل، سفپیم و تتراسایکلین به روش دیسک دیفیوژن Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test بررسی شد. در این روش پلیت با آگار مولر-هینتون[1] (Merck1.05437.0500) کشت داده شد، سپس بعد از سرد شدن و سفت شدن آگار، *باسیلوس سرئوس* به‌صورت کشت سفره‌ای در سطح پلیت کشت داده شد. بعد از تلقیح نمونه بر روی پلیت از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مختلف آمپی سیلین (۱۰ µg)، پنی‌سیلین (۱۰ µg)، وانکومایسین (۳۰ µg)، سفازولین (۳۰ µg)، متی سیلین(۵ µg)، سفکسیم (۵ µg)، سولفامتوکسازول تری متوپریم یا کوتریموکسازول (۲۳/۷۵ µg) / (۱/۲۵))، کلرامفنیکل (۱۰ µg)، سفپیم (۳۰ µg) و تتراسایکلین (۳۰ µg) (ROSCO diagnostica A/S, taastrupgaardssvej 30, DK-2630 Taastrup, Denmark, بر روی پلیت اضافه شد. این دیسک‌ها با مقدار مشخصی از یک عامل میکروبی واکنش می‌دهند. پلیت‌ها را به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد، سپس نواحی خالی از باکتری با ابعاد مختلف در اطراف دیسک‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. این نواحی به مناطق مهاری یا هاله عدم‌رشد معروف هستند و بیانگر حساسیت باکتری *باسیلوس سرئوس* به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده هستند. هرچه هاله عدم رشد اطراف باکتری *باسیلوس سرئوس* بزرگتر باشد حاکی از حساسیت بیشتر آن به عامل ضدمیکروبی است (CLSI M100, 2021 and 2005).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های بدست آمده از تحقیق توسط آزمون‌های آماری توصیفی بر اساس فراوانی درصد موارد حساس، نیمه حساس و مقاوم باسیلوس سرئوس های جدا شده از نمونه شیرخشک نوزاد نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی سیلین،پنی سیلین،وانکومایسین،سفازولین،متی سیلین،سفکسیم،سولفامتوکسازول تری متوپریم،کلرامفنیکل، سفپیم و تتراسایکلین مورد تحلیل توصیفی قرار گرفت. سپس در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن معنی داری یا عدم معنی داری درصد فراوانی موارد حساس، نیمه حساس و مقاوم مورد بررسی قرار گرفت تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی حضور *باسیلوس سرئوس* در نمونه‌های مورد مطالعه

از میان ۶۰۰ نمونه مورد مطالعه، ۳۰ نمونه شیرخشک نوزاد (۵ درصد) آلوده به *باسیلوس سرئوس* بودند. از ۳۰ نمونه شیرخشک نوزاد آلوده با *باسیلوس سرئوس*، ۱۸ نمونه (۶۰ ٪ از کل نمونه های شیرخشک نوزاد) دارای کمتر از ۱۰ CFU/g ، ۷ نمونه (۲۲/۳۳ ٪ از کل نمونه های شیرخشک نوزاد) ۱۰ الی 10^2 CFU/g و ۵ نمونه (۱۶/۶۷ ٪ از کل نمونه های شیرخشک نوزاد) بیشتر از 10^2 CFU/g *باسیلوس سرئوس* بودند. در حالی که حد مجاز آن در استاندارد ملی ایران برای شیرخشک نوزادان 10^2 CFU/g می‌باشد (استاندارد ملی ایران به شماره ۵۸۳۹، ۱۳۹۷).

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 شیرخشک 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 شیرخشک پس از باز کردن درب 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 کشور استرالیا از هر ۵ نمونه شیرخشک، بیش از یک نمونه حاوی 10^2 CFU/g نبوده و حداقل سه نمونه از

[1] Muller-Hinton agar

آنها دارای کمتر از ۱۰ CFU/g *باسیلوس سرئوس* باشد (Rahimifard et al., 2017). براساس مطالعات مشابه در ایران، باکتری *باسیلوس سرئوس* بیشترین باکتری جدا شده از شیرخشک بوده است. رحیمی‌فرد و همکاران (۱۳۸۶)، ۶۰ نمونه شیرخشک نوزاد را از نظر وجود *باسیلوس سرئوس* مورد ارزیابی قرار دادند و گزارش کردند که از میان ۶۰ نمونه شیرخشک 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.

با توجه به فرصت‌طلب بودن *باسیلوس سرئوس* و همچنین گسترش استفاده از شیرخشک در جوامع امروزی، لازم است توجه ویژه‌ای به کنترل کیفیت شیرخشک‌های وارداتی و نظارت دقیق بر کارخانه‌های تولیدی این محصول صورت گیرد (Vidic et al., 2020; Liu *et* al., 2020). همچنین از آنجایی که *باسیلوس سرئوس* قادر به ایجاد مسمومیت غذایی بوده، ارزیابی وجود آن در مواد غذایی بسیار مهم می‌باشد. سندرم اسهال در رابطه با لبنیات (شیر)، سبزیجات، غذاهای گوشتی و انواع سس گزارش شده در صورتی که فرآورده‌های نشاسته‌ای از قبیل برنج و ماکارونی در ایجاد سندروم تهوع دخالت دارد (Tewari and Abdullah, 2015; McDowell et al., 2021). در بین مواد غذایی، شیرخشک نوزادان به‌علت سن بسیار کم مصرف‌کنندگان از حساسیت بیشتری برخوردار می‌باشد. هنگام بسته‌بندی شیرخشک نوزادان در کارخانجات تولیدی، در صورت تمیز نبودن محیط اطراف امکان آلودگی شیرخشک با اسپور *باسیلوس سرئوس* نیز وجود دارد. شیر تهیه شده از شیرخشک نوزاد حاوی 10^2 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 میلی‌متر در یک وعده توسط نوزاد مصرف شود و همچنین شیر تهیه شده با آب جوشیده سرد پس از شش ساعت نگهداری در دمای محیط می‌تواند ایجاد بیماری نماید (Liu *et al*., 2020).

در مطالعه‌ای دیگر Di pinto و همکارانش (۲۰۱۳) از مجموع ۶۰ نمونه شیرخشک، ۱۱ نمونه (۱/۶۷ درصد) را آلوده به باسیلوس تشخیص دادند که کمتر از درصد *باسیلوس سرئوس* مشاهده در مطالعه ما (۲۱/۲۵ درصد) بود. این درصد متفاوت از حضور *باسیلوس سرئوس* در این مطالعه و مطالعه ما می‌تواند به علت کیفیت شیرهای خام مورد استفاده، متفاوت بودن شرایط اقلیمی ونظارت بالا بر روی کارخانه‌های تولیدی باشد. Tunio و همکاران (۲۰۱۳) در پژوهشی ۲۱ نمونه شیرخشک را از لحاظ آلودگی میکروبی مورد بررسی قرار دادند که پنج نمونه (۲۳/۸۱ درصد) آلوده به *باسیلوس سرئوس* بودند که با نتایج مطالعه حاضر مبنی بر آلودگی ۵ درصد از شیرخشک‌های مورد مطالعه به *باسیلوس سرئوس* همخوانی داشت. رنجبر و شهررضا (۲۰۱۷) در بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *باسیلوس سرئوس* جداسازی شده از غذاهای کودک مبتنی بر شیر گزارش کردند که از ۳۰۰ نمونه مورد مطالعه، ۹ نمونه (۳ درصد) آلوده به *باسیلوس سرئوس* بودند. همچنین میزان آلودگی در محدوده CFU/g ۴۱/۵-۱۲/۵ بود که کمتر از مقدار آلودگی به *باسیلوس سرئوس* مشاهده شده در مطالعه حاضر برای شیرخشک (۵ درصد) بود. دلیل این امر می‌تواند مرتبط با عواملی از قبیل نوع شیر مصرفی، نظارت و پایش دقیق شیر در کارخانه‌ها و غیره باشد.

در مطالعه‌ای دیگر رحیمی و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که از ۲۰۰ غذای کودک مورد مطالعه، ۸۴ نمونه (۴۲ درصد) آلوده بودند (Rahimifard et al., 2012) درحالی که در مطالعه ما، فقط ۲۰ درصد نمونه‌های جمع-آوری شده از ۱۵۰ نمونه شیرخشک نوزاد، آلوده به *باسیلوس سرئوس* بودند. این تفاوت می‌تواند به دلایل مختلفی اعم از کیفیت بالای شیرهای مورد مطالعه، گزارشات متعدد آلودگی و متعاقب آن افزایش اقدامات

اصلاحی، نظارت، کنترل و برخورد برای ارتقاء کیفیت محصولات تولیدی و وارداتی (Rahimifard et al., 2012)، نظارت و بازرسی دقیق در کارخانه‌ها، اقلیم‌های متفاوت و غیره باشد (Di Pinto et al., 2013).

عوامل زیادی در کیفیت میکروبی شیر خام مؤثرند که از این بین چهار منبع اصلی برای آلودگی میکروبی شیر خام در نظر گرفته شده است. این منابع شامل: درون مخزن پستان دام، بخش‌های بیرونی پستان دام، عوامل محیطی و تجهیزات شیردوشی و نگهداری شیرخام می‌باشد. جهت تهیه شیر و فرآورده‌های ایمن و مناسب از آن، می‌بایستی عملیات خوب بهداشتی، براساس روش‌های کنترلی طی زنجیره تولید تا مصرف رعایت گردد که احتمالاً این پیش‌نیازها در برخی از زنجیره‌های تأمین شیر خام چندان مورد توجه قرار نگرفته است (Ndahetuye et al., 2020). در مطالعه انجام شده توسط مرادی خاتون‌آبادی و همکاران (۱۳۹۲) که بر روی شیرخامه دریافتی کارخانه‌های تولیدکننده پنیرهای فراپالایشی در گرگان انجام دادند، گزارش کردند که فرآیند پاستوریزاسیون در حذف *باسیلوس سرئوس* چندان موفق نبوده و این باکتری در محصولات لبنی پاستوریزه هم وجود دارد. لازم به ذکر است که در تحقیق حاضر، سایر نمونه های مواد غذایی (پنیر، بستنی و کیک) هیچ گونه آلودگی به *باسیلوس سرئوس* مشاهده نشد که علت آن به عوامل زیادی از قبیل رعایت بهداشت فردی کارگران، رعایت اصول بهداشتی در تهیه محصول و کیفیت بالای شیر و غیره باشد (شیرعلی‌پور، ۱۳۹۸).

در بررسی انجام شده توسط شیرعلی‌پور (۱۳۹۸)، از ۱۰۲ نمونه بستنی سنتی (۵۱ نمونه بستنی و ۵۱ نمونه آب‌هویج) جمع‌آوری شده از ۱۷ مرکز فروش بستنی سنتی در شهر زابل، ۳۱/۴ درصد آلودگی به *باسیلوس سرئوس* گزارش کردند درحالی که در مطالعه حاضر از ۱۵۰ نمونه بستنی مورد آزمایش، هیچ یک از نمونه‌ها آلوده به *باسیلوس سرئوس* نبودند. Zhou و همکاران (۲۰۰۸) در ارزیابی ۵۴ نمونه از شیرهای پاستوریزه پرچرب چینی جمع‌آوری شده از سوپرمارکت‌های ووهان چین در فصل بهار و پاییز، از ۱۰۲ جدایه باکتری شناسایی شده، ۹۲ جدایه *باسیلوس سرئوس* بودند. ۷۱/۴ درصد نمونه‌های جمع‌آوری شده در فصل بهار و ۳۳/۳ درصد نمونه‌های جمع‌آوری شده در فصل پاییز، آلوده به *باسیلوس سرئوس* بودند که از مقدار *باسیلوس سرئوس* مشاهده شده در مطالعه حاضر برای شیرخشک (۵ درصد) بیشتر بود.

مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقادیر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه به روش دیسک دیفیوژن برای *باسیلوس سرئوس*‌های جدا شده از نمونه‌های شیرخشک نوزاد (۳۰ نمونه از ۱۵۰ نمونه) بررسی گردید. طبق نتایج بدست آمده مشخص گردید که از مجموع ۱۵۰ نمونه شیرخشک نوزاد مورد آزمایش، ۳۰ نمونه (۲۰ درصد) از نظر وجود *باسیلوس سرئوس* مثبت شدند (جدول مکمل). باکتری‌ها در تست آنتی‌بیوگرام، براساس قطر هاله عدم رشد به سه دسته حساس، نیمه‌حساس و مقاوم تقسیم می‌شوند (جعفری کزج، ۱۳۹۸). برای مقایسه قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها در تست آنتی‌بیوگرام استفاده شد که حساسیت و مقاومت جدایه‌های *باسیلوس سرئوس* جدا شده از ۳۰ نمونه شیرخشک نوزاد برحسب پروتکل CLSI[1] نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در جدول ۱ آورده شده است. نتایج حاصل از تست آنتی‌بیوگرام نشان داد که بیشترین میزان حساسیت معنی دار نسبت به آنتی‌بیوتیک وانکومایسین (۷۶/۶۷ ٪) بود ($p\leq$۰/۰۵). میزان حساسیت تتراسایکلین ۷۰ درصد و کلرامفنیکل ۶۳/۳۳ مشاهده شد. میزان حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سولفامتوکسازول تری متوپریم و سفپیم به ترتیب ۴۳/۳۳ و ۲۳/۳۳ درصد بود. حساسیت *باسیلوس سرئوس* های جدا شده از نمونه شیرخشک های بررسی شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های متی سیلین ۶/۶۶ ، سفازولین و آمپی سیلین ۳/۳۳ درصد بود و هیچ گونه حساسیتی نسبت به

[1] Clinical & Laboratory Standards Institute

آنتی بیوتیک های پنی سیلین و سفکسیم نداشت. با توجه به نتایج مشخص گردید که فراوانی درصد موارد نیمه حساس باکتری‌های جدا شده مورد بررسی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در رنج صفر تا ۲۳/۳۳ درصد قرار داشت. بیشترین میزان مقاومت نسبت به پنی سیلین (۱۰۰ درصد)، سفکسیم (۱۰۰ درصد) و آمپی سیلین (۹۶/۶۷ درصد) بود. میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفازولین و متی‌سیلین ۷۳/۳۴ درصد بود. *باسیلوس سرئوس* های جدا شده از نمونه شیرخشک های بررسی شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم و سولفامتوکسازول تری متوپریم به ترتیب میزان مقاومت ۶۳/۳۳ و ۵۳/۳۴ درصد را نشان دادند. میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل و تتراسایکلین به ترتیب ۱۶/۶۷ و۱۳/۳۳ درصد بود و هیچ گونه مقاومتی نسبت به آنتی بیوتیک وانکومایسین نداشت.

جدول ۱- فراوانی درصد موارد حساس، نیمه حساس و مقاوم *باسیلوس سرئوس* های جدا شده از نمونه شیرخشک نوزاد نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده

آمپی سیلین	(۱) ٪۳/۳۳^{g}	(۰) ٪۰^{f}	(۲۹) ٪۹۶/۶۷^{b}
پنی سیلین	(۰) ٪۰^{h}	(۰) ٪۰^{f}	(۳۰) ٪۱۰۰^{a}
وانکومایسین	(۲۳) ٪۷۶/۶۷^{a}	(۷) ٪۲۳/۳۳^{a}	(۰) ٪۰^{h}
سفازولین	(۱) ٪۳/۳۳^{g}	(۷) ٪۲۳/۳۳^{a}	(۲۲) ٪۷۳/۳۴^{c}
متی سیلین	(۲) ٪۶/۶۶^{f}	(۶) ٪۲۰^{b}	(۲۲) ٪۷۳/۳۴^{c}
سفکسیم	(۰) ٪۰۰^{h}	(۰) ٪۰٪۰^{f}	(۳۰) ٪۱۰۰^{a}
سولفامتوکسازول تری متوپریم	(۱۳) ٪۴۳/۳۳^{d}	(۱) ٪۳/۳۳^{e}	(۱۶) ٪۵۳/۳۴
کلرامفنیکل	(۱۹) ٪۶۳/۳۳^{c}	(۶) ٪۲۰^{b}	(۵) ٪۱۶/۶۷^{f}
سفپیم	(۷) ٪۲۳/۳۳^{e}	(۴) ٪۱۳/۳۴^{d}	(۱۹) ٪۶۳/۳۳^{e}
تتراسایکلین	(۲۱) ٪۷۰^{c}	(۵) ٪۱۶/۶۷^{c}	(۴) ٪۱۳/۳۳^{g}

اساس روش انتشار دیسک، مهار رشد باکتری‌های کشت شده بر روی محیط کشت توسط آنتی‌بیوتیک موجود بر دیسک و تشکیل و گزارش هاله عدم رشد می‌باشد. قطر هاله‌ی عدم رشد نشان از قدرت آنتی‌بیوتیک برای درمان میکروارگانیسم‌های مختلف است که بر همین اساس نوع آنتی‌بیوتیک و در آزمایش کمترین غلظت مهارکنندگی دوز آنتی‌بیوتیک برای میکروارگانیسمی خاص تعیین می‌گردد (Rahimifard et al., 2016; Rahimifard et al., 2007). از آنجایی که *باسیلوس سرئوس* دارای اهمیت بالینی است، تعیین مقاومت آن در برابر عوامل ضدمیکروبی از اهمیت زیادی برخوردار است. گزارش‌های قبلی نشان داده است که *باسیلوس سرئوس* حساس به ونکومایسین است. همچنین اکثر سویه‌ها حساس به کلرامفنیکل، سیپروفلوکساین، جنتامایسین و اریترومایسین هستند (Logan and Rodrigez-Diaz, 2006؛ Owusu-Kwarteng et al., 2017). برخی از سویه‌های *باسیلوس سرئوس* نسبت به کلیندامایسین و تتراسایکلین حساس هستند (Owusu-Kwarteng et al., 2017). تولید فراوان بتالاکامتازها توسط باکتری‌ها از جمله گونه‌های باسیلوس، علت شایع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها است (Owusu-Kwarteng et al., 2017؛ Park et al., 2009). مشخص شده که ژنوم نوع وحشی[1] بسیاری از باکتری‌ها از جمله گونه‌های باسیلوس دارای ژن‌های کدکننده تولید بتالاکتاماز هستند، با این حال این

[1] Wild-type genomes

بتالاکتامازهای کروموزمی مقاومت آنتی‌بیوتیکی مؤثری در باسیل‌های دارای ژنوم نوع وحشی ندارند علیرغم شواهدی که نشان می‌دهند ژن‌ها به‌طور کامل خاموش[1] نشده‌اند (Owusu-Kwarteng et al., 2017). در مطالعه‌ای مشابه با نتایج حاصل از تحقیق حاضر، شیرعلی‌پور (۱۳۹۸) گزارش کردند که تمامی باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* استخراج شده از بستنی‌های سنتی تولید شده در شهر زابل، به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و جنتامایسین حساسیت نشان دادند، همچنین ۱۰۰ درصد آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، پنی‌سیلین و آموکسی‌کلا و ۹۳/۸ درصد به سفکسیم مقاومت نشان دادند که همسؤ با یافته‌های تحقیق حاضر مبنی بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی *باسیلوس سرئوس*‌های جداسازی شده از شیرخشک نوزاد نسبت به پنی سیلین (۱۰۰ درصد)، سفکسیم (۱۰۰ درصد) و آمپی سیلین ۹۶/۶۷ درصد بود، همخوانی داشت.

در مطالعه‌ای دیگر، رنجبر و شهررضا (۲۰۱۷) در بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *باسیلوس سرئوس* جداسازی شده از غذاهای کودک مبتنی بر شیر دریافتند که *باسیلوس سرئوس* بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ درصد)، تتراسایکلین (۷/۷۷ درصد) و اگزاسیلین (۶۶/۶ درصد)، آمپی‌سیلین (۴۴/۴۴ درصد) نشان داد که با یافته‌های مطالعه حاضر مبنی بر مقاومت بالای *باسیلوس سرئوس* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های به پنی سیلین (۱۰۰ درصد)، سفکسیم (۱۰۰ درصد) و آمپی سیلین ۹۶/۶۷ درصد، همخوانی داشت.

دلیل مقاومت بالای *باسیلوس سرئوس* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل آمپی‌سیلین می‌تواند مرتبط با سنتز بالای بتالاکتاماز باشد (Ranjbar and Shahreza, 2017). در مطالعه‌ای دیگر Tewari و همکاران (۲۰۱۲) همسؤ با یافته‌های مطالعه حاضر، شیوع بالای مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین را گزارش کردند. Enayat و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که گونه‌های *باسیلوس سرئوس* از غذاهای با منشأ حیوانی، دارای بالاترین سطح مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین هستند که مشابه یافته‌های مطالعه حاضر بود.

در مطالعه‌ای دیگر، Owusu-Kwarteng و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *باسیلوس سرئوس*‌های جدا شده از شیر و فرآورده‌های شیری گزارش کردند که *باسیلوس سرئوس*‌های جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۹۸ درصد)، اگزاسیلین (۹۲ درصد)، پنی‌سیلین (۱۰۰ درصد)، آموکسی‌سیلین (۱۰۰ درصد) و سفپیم (۱۰۰ درصد) مقاوم بودند و نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، سیپروفلوکساسین، کلیندامایسین، اریترومایسین، جنتامایسین، کینوپریستین/دالفوپریستین، ریفامپین، تتراسایکلین و ونکومایسین حساسیت نشان داده بودند، که با یافته‌های مطالعه حاضر مبنی بر حساسیت باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* جداسازی شده از شیرخشک نوزاد نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های وانکومایسین (۷۶/۶۷ درصد)، تتراسایکلین (۷۰ درصد) و کلرامفنیکل ۶۳/۳۳ درصد، سولفامتوکسازول تری متوپریم (۴۳/۳۳ درصد) و سفپیم (۲۳/۳۳ درصد)، متی سیلین (۶/۶۶ درصد)، سفازولین و آمپی سیلین (۳/۳۳ درصد) و هیچ گونه حساسیتی نسبت به آنتی بیوتیک های پنی سیلین و سفکسیم نداشت، همخوانی داشت.

[1] Silenced

جدول مکمل- مقادیر قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)

نمونه	آمپی سیلین	پنی سیلین	وانکومایسین	سفازولین	متی سیلین	سفکسیم	سولفامتوکسازول تری متوپریم	کلرامفنیکل	سفپیم	تتراسایکلین
۱	۱۵	۰	۲۰	۱۷	۰	۰	۰	۱۲	۲۰	۱۵
۲	۱۵	۰	۲۱	۱۵	۰	۰	۲۲	۲۲	۰	۳۴
۳	۱۵	۰	۱۷	۱۴	۰	۰	۰	۱۶	۰	۳۳
۴	۱۵	۰	۱۷	۱۴	۱۴	۰	۲۵	۱۷	۱۳	۱۳
۵	۲۶	۰	۲۰	۲۱	۰	۰	۲۷	۲۴	۱۵	۱۶
۶	۲۲	۰	۱۶	۱۷	۰	۰	۲۸	۲۳	۲۳	۳۴
۷	۰	۰	۲۰	۱۷	۱۲	۰	۰	۲۱	۰	۳۰
۸	۰	۰	۲۰	۱۳	۰	۰	۰	۲۰	۰	۳۲
۹	۰	۰	۱۶	۱۱	۰	۰	۰	۱۲	۰	۲۱
۱۰	۱۱	۰	۲۳	۱۶	۰	۰	۳۲	۱۱	۱۹	۱۶
۱۱	۳۵	۰	۲۶	۲۰	۰	۱۱	۲۵	۱۸	۲۲	۳۰
۱۲	۱۵	۰	۲۲	۱۲	۰	۰	۲۳	۰	۱۶	۳۶
۱۳	۲۶	۰	۱۸	۲۰	۱۳	۰	۳۵	۲۰	۰	۳۴
۱۴	۰	۰	۲۰	۰	۰	۰	۰	۲۰	۰	۲۲
۱۵	۱۸	۰	۲۰	۰	۰	۰	۰	۲۱	۰	۳۳
۱۶	۲۴	۰	۲۱	۲۰	۱۱	۰	۲۷	۲۱	۰	۲۰
۱۷	۰	۰	۱۶	۰	۰	۰	۰	۲۲	۰	۲۴
۱۸	۰	۰	۱۶	۱۱	۰	۰	۰	۲۵	۰	۲۸
۱۹	۰	۰	۲۲	۱۵	۱۴	۰	۰	۲۵	۰	۳۰
۲۰	۲۶	۰	۱۹	۱۷	۰	۰	۳۲	۲۵	۲۲	۱۵
۲۱	۰	۰	۱۶	۰	۰	۰	۰	۲۴	۰	۲۷
۲۲	۱۱	۰	۱۷	۱۷	۰	۰	۰	۱۶	۰	۲۴
۲۳	۲۰	۰	۱۷	۲۳	۰	۰	۳۰	۲۴	۲۴	۰
۲۴	۰	۰	۲۰	۰	۰	۰	۱۲	۰	۳۳	۰
۲۵	۰	۰	۱۶	۰	۰	۰	۰	۲۴	۰	۲۵
۲۶	۱۸	۰	۲۱	۲۲	۱۲	۰	۲۶	۲۵	۱۷	۰
۲۷	۱۷	۰	۱۸	۲۲	۱۱	۰	۲۶	۲۵	۱۷	۱۶
۲۸	۰	۰	۱۸	۱۸	۰	۰	۰	۱۷	۰	۳۰
۲۹	۰	۰	۱۶	۲۰	۰	۰	۰	۱۷	۰	۳۱
۳۰	۱۱	۰	۱۸	۱۸	۱۱	۰	۰	۲۰	۰	۲۶

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تحقیق حاضر حاکی از عدم آلودگی کیک، بستنی و پنیر با *باسیلوس سرئوس* در نمونه های مورد مطالعه بود. اما از ۱۵۰ نمونه شیرخشک نوزاد، ۳۰ نمونه آلوده به *باسیلوس سرئوس* (۵ نمونه بیشتر از 10^2 CFU/g) بودند. نتایج آنتی‌بیوگرام حاکی از آن بود که *باسیلوس سرئوس*های جدا شده از شیرخشک نوزاد نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های وانکومایسین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل بیشترین میزان حساسیت و به آنتی‌بیوتیک پنی سیلین، سفکسیم و آمپی سیلین بیشترین میزان مقاومت را نشان دادند. علاوه بر این، *باسیلوس سرئوس*های جدا شده به‌طورکلی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مقاوم اما در برابر سایر آنتی‌بیوتیک‌ها حساسیت نشان دادند. به‌طور کلی به‌نظر می‌رسد شیر خام ورودی به کارخانه‌های شیرخشک یا شیرخشک‌های وارداتی از کیفیت پایینی برخوردار باشد. از این‌رو لازم است توجه ویژه‌ای به به کنترل کیفیت شیرخشک‌های وارداتی، نظارت دقیق بر واحدهای تولیدی

ایـن محصـول در ایـران، اعمـال روش‌هـای خـوب تولیـد، سیسـتم آنـالیز خطـر و کنتـرل بحرانـی، فـراهم نمـودن محیطـی بهداشـتی در گاوداری‌هـا، رعایـت اصـول استریلیزاسیون در حین شیردوشی، اجرای نکات بهداشتی پس از اعمال حرارت به شـیر، رعایـت شـرایط مناسـب در حین بسته‌بندی و تولیدی جهـت جلـوگیری از آلـودگی و شـیوع بیمـاری احتمـالی بـا *باسـیلوس سـرئوس* در فرآورده‌های غـذایی بـالاخص فرآورده‌هـای لبنـی صـورت بگیرد.

منابع

1. Alanber MN., Alharbi NS., and Khaled JM (2020). Evaluation of multidrug-resistant *Bacillus* strains causing public health risks in powdered infant milk formulas. J Infect Public Health. 13(10):1462-1468.
2. Becker H., Schaller G., von Wiese W., and Terplan, G (1994). *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. Int J Food Microbial. 23(1):1-15.
3. Bottone EJ (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. Clin Microbiol Rev. 23(2):382-98.
4. CLSI guideline on methods for antimicrobial susceptibility testing for human Mycoplasmas (M43), 2011.
5. Cui Y., Liu X., Dietrich R., Märtlbauer E., Cao J., Ding S.,n and Zhu K (2016). Characterization of *Bacillus cereus* isolates from local dairy farms in China. FEMS Microbiol Lett. 363(12): fnw096.
6. Di Pinto A., Bonerba E., Bozzo G., Ceci E., Terio V., and Tantillo G (2013). Occurence of potentially enterotoxigenic *Bacillus cereus* in infant milk powder. Europ Food Res Technol. 237(2):275-9.
7. Gao T., Ding Y., Wu Q., Wang J., Zhang J., Yu S., Yu P., Liu C., Kong L., Feng Z., Chen M., Wu S., Zeng H., and Wu H (2018). Prevalence, virulence genes, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of *Bacillus cereus* isolated from pasteurized milk in China. Front Microbiol 9:533.
8. Griffiths MW, Scraft H (2017). *Bacillus cereus* Food Poisoning. In Foodborne Diseases, Third Ed., Revised by Christine E R Dodd. 395-405.
9. Hwang JY., and Park JH (2015). Characteristics of enterotoxin distribution, hemolysis, lecithinase, and starch hydrolysis of *Bacillus cereus* isolated from infant formulas and ready-to-eat foods. J Dairy Sci 98:1652–1660.
10. Khatun M, Bera P., Mitra D., Mandal A., and Samanta A (2012). Estimation of Heavy metal tolerance and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* isolated from municipal solid waste. Int J Pharm Bio Sci. 3(4):819–29.
11. Lesley MB., Ernie SR., Kasing A., and Son R (2017). Detection of *Bacillus cereus* in formula milk and ultra-high temperature (UHT) treated milk products. Int Food Res. J 24(3): 985-989.
12. Mahon CR., Lehman DC., Manuselis G (2011). Textbook of diagnostic microbiology. 4th ed. W. B Saunders Co., Philadelphia, PA.
13. Mohamed AS., Alnakip MEA., and Abd-El Aal SF (2016). Occurrence of *Bacillus cereus* in raw milk and some dairy products in Egypt. Jpn J Vet Res 64(2):S95-103.
14. Ojdana D., Sacha P., Wieczorek P., Czaban S., Michalska A., Jaworowska J., Jurczak A., Poniatowski B., and Tryniszewska E (2014). The occurrence of $bla_{\text{CTX-M}}$, bla_{SHV}, and bla_{TEM} genes in Extended-Spectrum β-lactamase-positive strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* in Poland. Int J Antibiot. 2014: 935842.
15. Oliwa-Stasiak K., Molnar CI., Arshak K., Bartoszcze M., and Adley CC (2010). Development of a PCR assay for identification of the *Bacillus cereus* group species. J Appl Microbiol. 108(1): 266-73.
16. Owusu-Kwarteng J., Wuni A., Akabanda F., Tano-Debrah K., and

Jespersen L (2017) Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from dairy farms and traditional dairy products. BMC Microbiol. 17(1):65.

17. Rahimi E., Abdos F., Momtaz H., Baghbadorani ZT., and Jalali M (2013). *Bacillus cereus* in infant foods: prevalence study and distribution of enterotoxigenic virulence factors in Isfahan Province, Iran. Sci world J. 2013:292571.
18. Rahimifard N., Fatholahzadeh B., Noory Z., Saadati SH., Zavar M., Pirouz B., Asghari SH., Khezripour M., and Saberi S (2007). *Bacillus cereus* contamination in infant formula: a study in food and drug control laboratory. Tehran Univ Med J. 65(8):64-8.
19. Ranjbar R., and Shahreza MH (2017). Prevalence, antibiotic-resistance properties and enterotoxin gene profile of *Bacillus cereus* strains isolated from milk-based baby foods. Trop J Pharm Res. 16(8):1931-7.
20. Reiner K (2016). Catalase Test Protocol, American Society for Microbiology, [Created on: 11 November 2010]. Revised on 2016:1-9.
21. Reis AL., Montanhini M., Bittencourt JV., Destro MT., and Bersot LS (2013). Gene detection and toxin production evaluation of hemolysin BL of *Bacillus cereus* isolated from milk and dairy products marketed in Brazil. Braz J Microbiol. 44(4): 1195-8.
22. Rowan NJ., and Anderson JG (1997). Maltodextrin stimulates growth of *Bacillus cereus* and synthesis of diarrheal enterotoxin in infant milk formulae. Appl Environ Microbiol. 63(3):1182-4.
23. Sadek ZI., Abdel-Rahman MA., Azab MS., Darwesh OM., and Hassan MS (2018). Microbiological evaluation of infant foods quality and molecular detection of *Bacillus cereus* toxins relating genes. Toxicol Rep. 5:871-877.
24. Senesi S., and Ghelardi E (2010). Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. Toxins. 2(7):1690-703.
25. Shaheen R., Andersson MA., Apetroaie C., Schulz A., Ehling-Schulz M., Ollilainen VM., and Salkinoja-Salonen MS (2006). Potential of selected infant food formulas for production of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. Int J Food Microbiol. 107(3):287-94.
26. Soltan Dallal MM., Nezamabadi S., Mardaneh J., Rajabi Z., and Sirdani A (2017). Detection of toxigenic *Bacillus cereus* strains in powdered infant formula (PIF) milk by PCR assay. Tehran Med J 75(3):179-86.
27. Tallent SM., Kotewicz KM., and Bennett RW (2012). efficient isolation and identification of *Bacillus cereus* group. J AOAC Int. 95(2):446-51.
28. Zhang Z., Feng L., Xu H., Liu C., Shah NP., and Wei H (2016). Detection of viable enterotoxin-producing *Bacillus cereus* and analysis of toxigenicity from ready-to-eat foods and infant formula milk powder by multiplex PCR. J Dairy Sci. 99(2):1047-55.

Evaluation of the prevalence rate and antibiotic resistance pattern of Bacillus cereus in infant formula and foods containing formula

Omidi B [1], Safaian S.H[2*], Rahimi Fard N[1,2], Mosavi Nadoshen R[1], Porakbari B[1,3]

1. Department of Food Industry, North Tehran Branch Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Faculty of Paramedicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Tehran University of Medical Sciences Tehran, Tehran, Iran.

***Corresponding author**: *shila2462462@yahoo.co.in*

Received: 10 January 2022 Accepted: 23 July 2023

Abstract

The present study was conducted with the aim of evaluating the antibiotic resistance pattern of *Bacillus* cereus in ice cream, cake, cheese, and infant formula. For this purpose, 600 samples were prepared from food sales centers in Tehran and transferred to the quality control laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine of Tehran University of Medical Sciences and cultured on the special culture medium of *Bacillus* cereus, MYP, which contained polymyxin B supplement and egg yolk. Then, from the pink colonies, gram staining and catalase test were performed and the sensitivity of the isolated bacteria to ampicillin, penicillin, vancomycin, cefazolin, methicillin, cefixime, sulfamethoxazole, trimethoprim, chloramphenicol, cefepime and tetracycline was evaluated based on the disc diffusion method. According to the results, no contamination with B. cereus was observed in any of the cake, cheese and ice cream samples. However, out of 150 infant formula samples, 30 samples were infected with B. cereus (18 samples < 10 CFU/g, 7 samples had 10-102 CFU/g, and 5 samples>102 CFU/g). B. cereus isolated from infant formula has the highest sensitivity to vancomycin (67.76%), tetracycline (70%), and chloramphenicol (33.63%) antibiotics and had the highest level of resistance to penicillin (100%), cefixime antibiotics (100%) and ampicillin (67.96%). The general results indicated a significant prevalence of B. cereus in the tested milk, which due to the growing trend of using milk powder and more importance to the quality and health evaluation of milk powders for consumption, contamination investigation and preventive approaches should be given more attention.

Key words: infant formula, food, *Bacillus cereus*, antibiotic.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2023 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.