بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *کرونوباکتر ساکازاکی* جدا شده از انواع شیر خشک و غذای کودک

سمیرا عباسی بافطرت[1]، محمد گلی[2]*، حسن ممتاز[3]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان(خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان(خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

***نویسنده مسئول:** *mgolifood@yahoo.com, m.goli@khuisf.ac.ir*

تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۳/۲۵ تاریخ پذیرش :۱۷ /۱۳۹۵/۱۱

چکیده

کرونوباکتر ساکازاکی از اصلی‌ترین پاتوژن‌های منتقله از شیر خشک و غذای کودک آلوده، به نوزاد است و از عوامل اصلی مرگ و میر، بیماری گوارشی و مننژیت در نوزادان است. بررسی حاضر به تشخیص میکروبیولوژیکی و مولکولی *کرونوباکتر ساکازاکی* در نمونه‌های غذای کودک و شیر خشک نوزاد و بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های باکتریایی پرداخته است. ۲۰۰ نمونه غذای کودک و شیر خشک از برندهای مختلف جمع آوری و پس از کشت میکروبی، جدایه‌های باکتری با آزمون PCR مورد تشخیص قرار گرفت. سپس الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت. ۳ نمونه از کل ۱۰۰ غذای کودک (۳ درصد) و ۵ نمونه از کل ۱۰۰ شیر خشک نوزاد (۵ درصد) آلوده به *کرونوباکتر ساکازاکی* بود. برندهای A، B و C از شیر خشک نوزاد و برندهای A و D از غذای کودک آلوده به *کرونوباکتر ساکازاکی* بودند. برندهای B و C از شیر خشک نوزاد (هر کدام ۱۰ درصد) و برند A از غذای کودک (۸ درصد) آلوده به *کرونوباکتر ساکازاکی* بود. ایزوله‌های *کرونوباکتر ساکازاکی* بیشترین حساسیت را به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین (۲۰/۳۸)، مروپنم (۱۹/۸۳) و ایمی‌پنم (۱۹/۶۳) و بیشترین مقاومت را به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی سیلین، آمپی سیلین، تیجسیکلین، تیکارسیلین، آزترونام و سفتازیدیم نشان داد. بازرسی دقیق بر کیفیت مواد اولیه شیر خشک و غذای کودک و نظارت دقیق بر روند تولید و رعایت اصول بهداشتی و استفاده از ضد میکروب-های طبیعی از میزان شیوع آلودگی به این باکتری می‌کاهد.

واژگان کلیدی: *کرونوباکتر ساکازاکی*، غذای کودک، شیر خشک، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی.

مقدمه

شیر خشک و غذای نوزاد به راحتی در دسترس است و به عنوان یک مکمل یا جایگزین شیر مادر می باشد. شیر خشک نوزاد در طول فرایند تولید، حرارت داده می شود اما حرارتی که در طول تولید این محصول اعمال می شود به اندازه‌ای نیست که محصولی سترون تولید شود، لذا این محصول توسط اقدامات بهداشتی سخت‌گیرانه همراه با نظارت بر شرایط محیطی تولید می شود. این فعالیت‌ها به کاهش بار میکروبی شیر خشک نوزاد کمک می کند (Estuningsih, 2006; Iversen and Forsythe, 2004). *کرونوباکتر ساکازاکی* از باکتری‌های خانواده *انتروباکتریاسه*، یک باکتری گرم منفی، میله‌ای راست، هوازی- بی‌هوازی اختیاری، متحرک، دارای تاژک‌های پیرامونی و بدون اسپور است که از منابع بالینی مانند خون، خلط، ادرار، زخم، محتویات روده، دمل‌های چرکی، منابع محیطی نظیر آب، خاک، فاضلاب، فضولات حیوانات، مدفوع انسان و منابع غذایی متعددی جداسازی شده است. این باکتری تا سال ۱۹۸۰، *انتروباکتر کلوآکه*، با رنگدانه زرد، نامیده می‌شد. اختلاف اساسی آن با سایر گونه‌های جنس *انتروباکتر*، ناتوانی در تخمیر دی- سوربیتول و

توانایی تولید آنزیم داکسی ریبونوکلئاز خارج سلولی است. *انتروباکتر ساکازاکی* دارای ۴ گروه و ۵۷ سویه است (Estuningsih, 2006). در حال حاضر این باکتری به نام *کرونوباکتر ساکازاکی* نام‌گذاری شده است. توانایی تولید آنزیم آلفا- گلوکوزیداز سبب شده که از آن در طراحی محیط‌های کشت مختلف، برای جستجو و شناسایی این باکتری استفاده شود. *کرونوباکتر ساکازاکی* در دمای حداقل ۵/۵ درجه سلیسیوس و حداکثر ۴۷ درجه سلیسیوس قادر به رشد بوده و نسبت به سایر اعضای خانواده *انتروباکتریاسه* در برابر شرایط سخت محیطی مقاوم‌تر است، در نتیجه قدرت رقابت‌پذیری بیشتری با آن‌ها دارد. این باکتری در طی فرایند پاستوریزاسیون نابود می‌شود، بنابر این معمولا عامل آلودگی ثانوی به شمار می‌آید (Shaker et al., 2007). سپتی‌سمی، منتژیت، و انتروکولیت از شایع‌ترین بیماری‌های ایجاد شده توسط *کرونوباکتر ساکازاکی* بوده که از راه شیر خشک مخصوص تغذیه اطفال، پودر خوراک و خوراک رژیمی شیرخواران سبب بیماری و در نهایت مرگ و میر نوزاد می‌شود. موارد متعددی از بروز عفونت توسط *کرونوباکتر ساکازاکی* گزارش شده است که از راه آلوده شدن خوراک شیرخواران هنگام آماده‌سازی در منزل یا بیمارستان بر اثر عدم رعایت اصول بهداشتی اتفاق می‌افتد. اگرچه این باکتری در سایر مواد غذایی نیز یافت می‌شود و ممکن است در همه رده‌های سنی باعث بروز بیماری شود، ولی بیشتر در اطفال با سن کمتر از یک سال و خصوصاً در ۲۸ روز اول زندگی نوزاد سالم ایجاد بیماری می‌کند. نوزادان نارس، نوزادان با وزن پایین و یا دارای نقص ایمنی، بیشتر در معرض خطر هستند. در برخی واگیری‌ها، مرگ و میر ۲۰ تا ۵۰ درصدی نوزادان مبتلا به این باکتری گزارش شده است. بررسی وجود این میکروارگانیسم در شیر خشک نوزاد به لحاظ مستعد و حساس بودن کودکان از اهمیت به‌سزایی برخوردار است (Mardaneh et al., 2014). امروزه این باکتری نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک های رایج در درمان بیماری‌های عفونی مقاوم شده است. به واسطه اهمیت خاص این باکتری و احتمال انتقال آن از راه شیرخشک و غذای کودک به نوزاد این مطالعه با هدف ردیابی *کرونوباکتر ساکازاکی* در انواع غذای کودک به دو روش میکروبیولوژی و مولکولی (PCR) طرح ریزی شد.

مواد و روش کار

نمونه ها و جداسازی باکتری

در این مطالعه توصیفی- مقطعی، ۱۰۰ نمونه از ۸ برند تجارتی شیر خشک نوزاد و ۱۰۰ نمونه غذای کودک از ۴ برند مختلف عرضه شده در داروخانه‌های شهر اصفهان، خریداری شد. برای هر نمونه‌برداری ، ۲۵ گرم از محتویات سه بسته با یک سری ساخت پس از مخلوط کردن کامل برداشته شد و در شرایط سترون در یک شیشه سترون ریخته شد. کلیه مراحل آزمون در زیر هود لامینار حاوی فیلتر هپا انجام گرفت. سپس آزمون‌های شناسایی *کرونوباکتر ساکازاکی* به روش استاندارد ملی ایران به شماره ۹۴۳۰ و با استفاده از محیط کشت های آب پپتونه بافری (Bpw) ، محیط کشت اصلاح شده آبگوشت تریپتوزلوریل سولفات (mLST)دارای وانکومایسین، محیط جداسازی زنگزای انتروباکترساکازاکی (ESIA) ، تریپتون سویا آگار (TSA)و تست های تائیدی اکسیداز،تخمیر کربوهیدارت ها و هیدرولیز سیترات انجام پذیرفت (سازمان ملی استاندارد ایران، ۱۳۸۶).

آزمایش مولکولی

ایزوله‌هایی که در روش کشت، *کرونوباکتر ساکازاکی* تشخیص داده شدند، به منظور تشخیص قطعی و تایید

شناسایی با روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند (Keyser et al; 2003). برای نیل به این هدف باکتری‌های جدا شده در مرحله قبل به مدت یک شب در محیط مایع (TBS) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت و DNA ژنومی باکتری‌های رشد یافته با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن ایران طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت، استخراج شدند. آزمایش PCR جهت بررسی حضور *کرونوباکتر ساکازاکی* جدا شده از نمونه‌ها با استفاده از زوج پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) در حجم ۵۰ میکرولیتر، واجد ۵ میکرولیتر بافر PCR-10x ، ۱/۵ میکرولیتر dNTP mix، ۲ میکرولیتر Mgcl2، ۱ میکرولیتر از زوج پرایمرها، ۱ واحد آنزیم Taq DNA پلیمراز و ۵ میکرولیتر از DNA هر نمونه با برنامه حرارتی ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۵ درجه سلیسیوس ۶۰ ثانیه، ۵۵ درجه سلیسیوس ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلیسیوس ۹۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۸ دقیقه انجام شد. پس از انجام واکنش PCR، ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل ۱ درصد آگارز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز و ژل حاصله با دستگاه تصویربردار از ژل (Uvi-tech. U. K.) قرائت گردید.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی *کرونوباکتر ساکازاکی*

نام ژن هدف	نام پرایمر	توالی پرایمر (5′_3′)	اندازه محصول (جفت باز)
16srRNA	Esak2	CCC GCATCT CTG CAG GAT TCT C	832
	Esak3	CTA ATA CCG CAT AAC GTC TAC G	

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جدا شده در این مطالعه از روش دیسک‌گذاری ساده استفاده شد. برای این منظور ایزوله‌های جدا شده به مدت یک شب در محیط مایع TSB در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس کشت و بعد از تهیه رقتی معادل نیم مک‌فارلند از آن‌ها به صورت کاملا پیوسته در محیط جامد مولرهینتون‌آگار کشت و در حضور دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (شرکت پادتن طب-ایران) شامل Ampicillin (10 µg/disk), Amoxicillin (20 µg/disk), Aztreonam(30 µg/disk), Cefotaxime (30 µg/disk), Amikacin (30 µg/disk), Streptomycin (10 µg/disk), Meropenm (10 µg/disk), Mezlocillin (30 µg/disk), Nalidixic acid (30 µg/disk), Tigecycline (15 µg/disk), Tetracycline (30 µg/disk), Ticarcillin (30 µg/disk), Chloramphenicol (30 µg/disk), Ceftazidime (30 µg/disk), Ciprofloxacin (5 µg/disk), Cefepime (30 µg/disk), Imipenem (10 µg/disk), Levofloxacin (5 µg/disk), Minocycline (30 µg/disk), Piperacillin (30 µg/disk), piperacillin-tazobactam, Carbenicillin (100 µg/disk), Tobramycin (10 µg/disk), Cotrimoxazole (30 µg/disk), Moxifloxacin (5 µg/disk), Gentamicin (10 µg/disk), Colistin (10 µg/disk) به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلیسیوس کشت داده شد. حساسیت یا مقاومت ایزوله‌ها نسبت به یک آنتی‌بیوتیک طبق جدول CLSI (موجود در کاتالوگ شرکت پادتن طب) تعیین و گزارش شد (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011).

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور تجزیه و تحلیل داده های بدست آمده از انجام آزمایش، نتایج حاصل از کلیه آزمایشات جهت آنالیز، به صفحه گسترده Microsoft Excel، منتقل شد. با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 18 ، و طرح کاملا تصادفی بررسی‌های آماری انجام پذیرفت و در مقادیر P<۰/۰۵ تفاوت معنی‌دار شناخته شد.

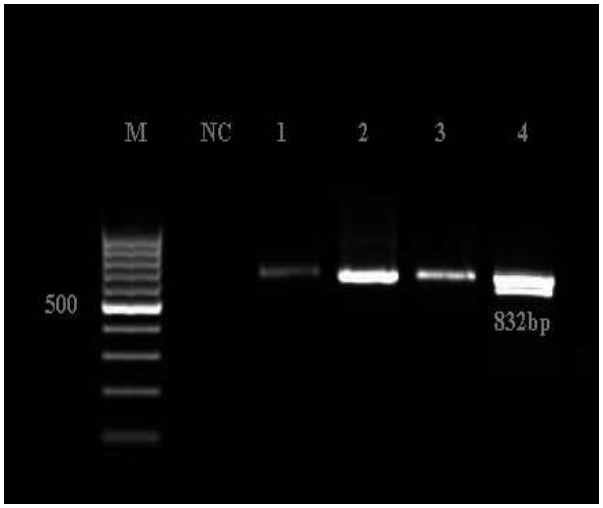
نتایج

فراوانی آلودگی شیر خشک و غذای کودک با *کرونوباکتر ساکازاکی*

در بررسی حاضر ۱۰۰ نمونه شیر خشک نوزاد از ۸ برند مختلف و ۱۰۰ نمونه غذای کودک از ۴ برند مختلف از نظر حضور *کرونوباکتر ساکازاکی* مورد ارزیابی قرار گرفت. جدول ۲ فراوانی حضور *کرونوباکتر ساکازاکی* را در نمونه‌های بررسی شده نمایش می دهد. نتایج نشان داد که از کل ۲۰۰ نمونه شیر خشک نوزاد و غذای کودک بررسی شده، ۸ نمونه (۴ درصد) آلوده به *کرونوباکتر ساکازاکی* بود. به این صورت که ۳ نمونه از کل ۱۰۰ نمونه غذای کودک (۳ درصد) و ۵ نمونه از کل ۱۰۰ نمونه شیر خشک نوزاد (۵ درصد) آلوده به *کرونوباکتر ساکازاکی* بود. یعنی برندهای A، B و C از شیر خشک نوزاد و برندهای A و D از غذای کودک آلوده به *کرونوباکتر ساکازاکی* بود. به این صورت که برندهای B و C از شیر خشک نوزاد (هر کدام ۱۰ درصد) و برند A از غذای کودک (۸ درصد) بیشترین آلودگی را با *کرونوباکتر ساکازاکی* داشت که نشان دهنده پایین بودن کیفیت محصول تولیدی در این برندها بود. این در حالی است که برندهای D، E، F، G و H شیر خشک نوزاد و برندهای B و C غذای کودک هیچ گونه آلودگی میکروبی با کرونوباکتر ساکازاکی نداشته و از کیفیت مطلوبی برخوردار بوده اند. شکل ۱ ژل حاصل از الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی *کرونوباکتر ساکازاکی* در نمونه‌های شیر خشک و غذای کودک را نمایش می دهد.

جدول۲- فراوانی آلودگی با کرونوباکتر ساکازی در نمونه های شیر خشک نوزاد و غذای کودک

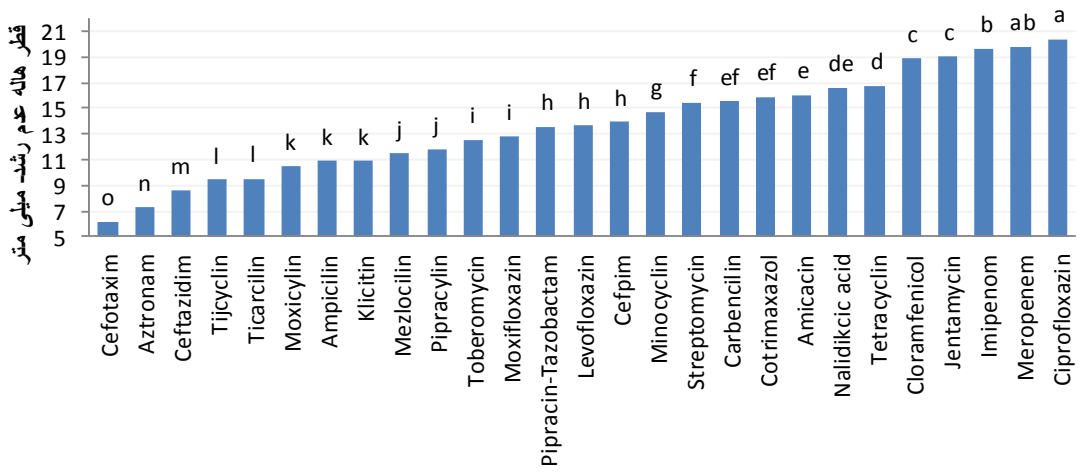
نوع نمونه/برند تجاری		تعداد نمونه جمع‌آوری شده	تعداد نمونه‌های آلوده	فراوانی *کرونوباکتر ساکازاکی* (٪)
شیر خشک نوزاد	A	۱۶	۱	۶/۲۵
	B	۲۰	۲	۱۰
	C	۲۰	۲	۱۰
	D	۱۰	۰	۰
	E	۸	۰	۰
	F	۸	۰	۰
	G	۸	۰	۰
	H	۱۰	۰	۰
	کل	۱۰۰	۵	۵
غذای کودک	A	۲۵	۲	۸
	B	۲۵	۰	۰
	C	۲۵	۰	۰
	D	۲۵	۱	۴
	کل	۱۰۰	۳	۳
کل		۲۰۰	۸	۴



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی *کرونوباکتر ساکازاکی* در نمونه‌های شیر خشک و غذای کودک M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، NC: کنترل منفی آزمون، ستون ۱-۳: نمونه‌های مثبت از نظر *کرونوباکتر ساکازاکی* و ستون ۴: کنترل مثبت آزمون

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *کرونوباکتر ساکازاکی*

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک ۸ ایزوله *کرونوباکتر ساکازاکی* جداسازی شده از نمونه‌های شیر خشک نوزاد و غذای کودک مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که قطر هاله عدم رشد ایزوله *کرونوباکتر ساکازاکی* جدا شده از شیر خشک نوزاد و غذای کودک با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف سنجیده شد. نتایج بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در شکل ۲ آمده است. نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که نوع آنتی‌بیوتیک به کار رفته تأثیر معنی‌دار بر میزان قطر هاله عدم رشد *کرونوباکتر ساکازاکی* دارد (در سطح ۵٪). نتایج نشان داد که ایزوله‌های *کرونوباکتر ساکازاکی* جدا شده از غذای کودک و شیر خشک نوزاد بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد را در هنگام استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکسازین (۲۰/۳۸)، مروپنم (۱۹/۸۳) و ایمی‌پنم (۱۹/۶۳) داشتند که از نظر آماری تفاوت معنی‌دار با یکدیگر نداشتند در صورتی که با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند (سطح ۵٪). *کرونوباکتر ساکازاکی* به این آنتی‌بیوتیک‌ها بیشترین حساسیت را نشان داد و رشد این باکتری را به میزان زیادی کاهش می‌دهد. ایزوله‌های *کرونوباکتر ساکازاکی* کمترین میزان قطر هاله عدم رشد را در هنگام استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، تیجسیکلین، تیکارسیلین، آزترونام و سفتازیدیم داشت که از نظر آماری آموکسی‌سیلین و آمپی‌سیلین نسبت به هم دارای تفاوت معنی‌داری نداشت. این روند برای آنتی بیوتیک‌های تیجسیکلین و تیکارسیلین نسبت به هم نیز مشاهده می‌شود. میزان قطر هاله عدم رشد ایزوله‌های *کرونوباکتر ساکازاکی* نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها در حد متوسط بود.



شکل ۲- مقایسه قطر هاله عدم رشد توسط انواع آنتی بیوتیک‌ها بر کرونوباکتر ساکازاکی در شیر خشک و غذای کودک

بحث

گونه‌های *کرونوباکتر* از جمله پاتوژن‌های فرصت طلب هستند، که میزان مرگ و میر ناشی از آن ها ۴۰ تا ۸۰ درصد برآورد شده است. این عوامل بیماری‌زا می توانند طیف وسیعی از بیماری‌های مهلک مانند مننژیت، سپتی‌سمی، انتروکولیت نوزادان، و آبسه‌های مغزی را ایجاد کنند. اگرچه *کرونوباکترها* می توانند عامل بیماری در بزرگسالان و کودکان باشند اما عفونت‌های نوزادان در ارتباط با شیر خشک نوزاد و غذای کودک بیش از سایر موارد دیده می شود. از آن جا که اولین شیوع عفونت *کرونوباکتر* در سال ۱۹۵۸ گزارش شد و شیر خشک نوزاد به عنوان منبع اصلی این شیوع بیماری شناخته شد در نتیجه بسیاری از شیر خشک‌های نوزادان از سطح داروخانه ها جمع آوری و آنالیز گردیدند. این آلودگی برای شیر خشک نوزاد به مشکلات عظیمی تبدیل شده است. به طوری که بررسی سلامت شیر خشک و غذای کودک از نظر حضور این باکتری الزامی است.

بررسی تشخیص *کرونوباکتر ساکازاکی*

بررسی حاضر به منظور تشخیص *کرونوباکتر ساکازاکی* در انواع شیر خشک و غذای کودک و ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های جداسازی شده انجام پذیرفت. نتایج بررسی حاضر نشان داد که از کل ۱۰۰ نمونه شیر خشک نوزاد از ۸ برند مختلف و ۱۰۰ نمونه غذای کودک از ۴ برند مختلف به ترتیب ۵ نمونه (۵ درصد) و ۳ نمونه (۳ درصد) آلوده به *کرونوباکتر ساکازاکی* بود که بسیار قابل توجه است. از جمله دلایل بالا بودن میزان شیوع باکتری در نمونه‌های شیر خشک و غذای کودک در مطالعه حاضر می توان به موارد زیر اشاره کرد:

مقاومت بالای *کرونوباکتر ساکازاکی* به شرایط محیطی از جمله دمای بالا و آب فعال پایین و تغییرات pH، دما و میزان آب فعال، کیفیت پایین مواد اولیه به کار برده شده برای تولید شیر خشک و غذای نوزاد، آلودگی های متقاطع نمونه های شیر خشک و غذای کودک در

کارخانه پس از اعمال حرارت لازم برای از بین بردن پاتوژن‌های احتمالی، عدم درزبندی مناسب قوطی‌های شیر خشک و بسته‌بندی‌های غذای کودک (به هر دلیلی) و ورود باکتری در مراحل مختلف تولید، نگهداری و انبار داری، حمل و نقل و توزیع، عدم رعایت صحیح اصول ایمنی و امنیت غذایی هم چون HACCP و GMP در کارخانجات تولید شیر خشک نوزاد و غذای کودک، عدم اعمال بازرسی دقیق بر روی نحوه تولید این فرآورده‌ها، در این زمینه مطالعات بسیار کمی انجام پذیرفته است: در تنها مطالعه‌ای که در ایران به منظور تشخیص *کرونوباکتر ساکازاکی* در نمونه‌های شیر خشک نوزاد انجام پذیرفته است (اسداللهی دهکردی و همکاران، ۱۳۹۳) در کل ۳۰۰ نمونه از ۷ برند تجارتی شیر خشک نوزاد عرضه شده در داروخانه‌ها خریداری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. سپس آزمون های شناسایی *کرونوباکتر ساکازاکی* با توجه به استاندارد ملی ایران به شماره ۹۴۳۰ انجام شد. سپس مشابه بررسی حاضر، ایزوله های *کرونوباکتر ساکازاکی* جداسازی شده با استفاده از آزمون PCR مورد تأیید قرار گرفت. نتایج نشان داد که از مجموع ۳۰۰ نمونه شیر خشک نوزاد، ۸ نمونه با استفاده از روش کشت میکروبی به عنوان آلوده از نظر حضور *کرونوباکتر ساکازاکی* شناسایی شدند (۲/۶۶ درصد) که از نتایج بررسی ما اندکی کمتر بود. از میان ۸ نمونه آلوده با *کرونوباکتر ساکازاکی* تنها ۱ نمونه با استفاده از آزمون PCR مثبت تشخیص داده شد که با نتایج بررسی ما کاملا مغایرت دارد. احتمالاً حساسیت و ویژگی متفاوت پرایمرهای استفاده شده در بررسی پیشین دلیل اصلی عدم توانایی آزمون PCR در تشخیص صحیح ایزوله‌های *کرونوباکتر ساکازاکی* جداسازی شده به روش کشت بوده است. در این بررسی ژن *Bgrx* که زیر واحد DNA gyrase B (آنزیم توپوایزومراز ۲) را کد می کند برای تشخیص *کرونوباکتر ساکازاکی* استفاده شده که احتمالاً از حساسیت کمتری نسبت به ژن *16SrRNA* که در بررسی ما مورد استفاده قرار گرفت، برخوردار است زیرا تمامی ۸ ایزوله *کرونوباکتر ساکازاکی* جداسازی شده با استفاده از کشت میکروبی، در آزمون PCR نیز مورد تأیید قرار گرفت. بنابراین استفاده از آزمون PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی برای ژن *16SrRNA* باکتری *کرونوباکتر ساکازاکی* جهت تشخیص سریع نکروزان مننژیت ناشی از گونه های کرونوباکتر در نوزادان راهکار بسیار مناسبی است که توسط نویسندگان بررسی حاضر پیشنهاد می شود. از طرفی دیگر روش کشت استاندارد برای تشخیص *کرونوباکتر ساکازاکی* ۷ روز به طول می انجامد لذا توسعه روش PCR برای تشخیص سریع و اختصاصی *کرونوباکتر ساکازاکی* در نمونه‌های شیر خشک نوزاد و غذای کودک به نظر منطقی می باشد. بررسی های کم و بیش پراکنده ای در این زمینه در سراسر نقاط جهان انجام پذیرفته است. در مطالعه انجام پذیرفته در کشور ایرلند (Food Safety Authority of Ireland, 2007)، از کل ۷۱۹ نمونه شیر خشک نوزاد مطالعه شده، هیچ نمونه ای آلوده به *کرونوباکتر ساکازاکی* نبود که نشان دهنده کیفیت بالای محصولات کشور ایرلند و رعایت کامل اصول بهداشتی در تولید غذای کودک است. در مطالعه ای که روی ۸ نمونه غذای کودک مشکوک جمع آوری شده از نقاط مختلف اردن انجام پذیرفت، ردیابی *کرونوباکتر ساکازاکی* در ۲ نمونه (۲۵ درصد) گزارش شد که تاکنون بیشترین میزان شیوع *کرونوباکتر ساکازاکی* در نمونه غذای کودک در سراسر جهان است (Shaker et al., 2007). در بررسی

کیفیت ۷۴ نمونه غذای کودک از نظر حضور *کرونوباکتر ساکازاکی* که در کشور اندونزی انجام پذیرفت، نتایج نشان داد ۱۰ نمونه (۱۳/۵ درصد) آلوده به *کرونوباکتر ساکازاکی* بود که به مراتب از نتایج بررسی ما بالاتر بود (Estuningsih et al., 2006). محققان انگلیسی اقدام به بررسی میزان شیوع *کرونوباکتر ساکازاکی* در نمونه‌های غذای کودک نمودند و نتایج نشان داد که از کل ۸۲ نمونه مطالعه شده، ۹ نمونه (۱۱ درصد) آلوده به *کرونوباکتر ساکازاکی* بود که با توجه به پیشرفت بهداشتی کشور انگلیس، نتایج شیوع بسیار بالایی را برای این باکتری نشان دادند(Forsythe and Iversen, 2004). در مطالعه ای در کشور آمریکا به بررسی میزان شیوع و سطح آلودگی نمونه‌های غذای کودک به *کرونوباکتر ساکازاکی* پرداخته شد. نتایج نشان داد که از کل ۲۲ نمونه بررسی شده، ۵ نمونه (۲۲/۷ درصد) آلوده به *کرونوباکتر ساکازاکی* بود و میانگین سطح آلودگی نمونه‌ها ۰/۳۶ CFU/100g بود(Zink 2003). همچنین ۱۲۰ نمونه شیر خشک نوزاد تولید شده در کارخانجات کشور کانادا مورد ارزیابی قرار گرفت که ۸ نمونه (۶/۸ درصد) آلوده به *کرونوباکتر ساکازاکی* گزارش شد و میانگین سطح آلودگی نمونه ها ۰/۳۶ CFU/100g برآورد گردید که بسیار قابل توجه بود(Nazarowec-White and Farber, 1997). میزان شیوع *کرونوباکتر ساکازاکی* در نمونه‌های غذای کودک جمع آوری شده از نقاط مختلف کشور هلند ۱۴/۲ درصد بود و میانگین سطح آلودگی نمونه ها ۰/۶۶ CFU/100g بود(Muytjens et al., 1988).

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *کرونوباکتر ساکازاکی* جدا شده از غذای کودک و شیر خشک نوزاد نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که ایزوله های *کرونوباکتر ساکازاکی* جدا شده از غذای کودک و شیر خشک نوزاد بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد در هنگام استفاده از آنتی بیوتیک های سیپروفلوکسازین (۲۰/۳۸)، مروپنم (۱۹/۸۳) و ایمی پنم (۱۹/۶۳) داشتند. *کرونوباکتر ساکازاکی* به این آنتی بیوتیک‌ها بیشترین حساسیت را نشان داد و رشد این باکتری را به میزان زیادی کاهش داد. ایزوله‌های *کرونوباکتر ساکازاکی* کم‌ترین میزان قطر هاله عدم رشد را در هنگام استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های موکسی سیلین، آمپی سیلین، تیجسیکلین، تیکارسیلین، آزترونام و سفتازیدیم نشان داد و این باکتری بالاترین میزان مقاومت را نسبت به این آنتی‌بیوتیک ها داشت. میزان قطر هاله عدم رشد ایزوله‌های *کرونوباکتر ساکازاکی* نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک در حد متوسط بود. از جمله دلایلی که می‌توان برای بالا بودن میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *کرونوباکتر ساکازاکی* جدا شده از شیر خشک و غذای نوزاد برشمرد می توان به تجویز بی‌رویه آنتی‌بیوتیک در فارم‌های حیوانات توسط دامپزشکان و احتمالاً انتقال سوش‌های مقاوم و یا ژن کدکننده مقاومت از طریق مواد اولیه مورد استفاده برای تولید شیر خشک یا غذای کودک به محصول نهایی، تجویز بی‌رویه و بدون توجه به نتایج بدست آمده از آنتی بیوگرام توسط پزشکان و انتقال ایزوله‌های مقاوم *کرونوباکتر ساکازاکی* از افراد آلوده‌ای که در کارخانجات و مراکز تولید مشغول به کار هستند به محصول نهایی، محدود بودن و عدم دسترسی دامپزشکان و بعضاً پزشکان به داروهای آنتی‌بیوتیکی جدید و تجویز آنتی‌بیوتیک‌های تکراری صرفاً با توجه به تجربه شخصی دامپزشکان و پزشکان در موارد

پیشـین بیمـاری و انتقـال ژن کـدکننـده مقاومـت آنتی‌بیوتیکی از ایزوله *کرونوباکتر ساکازاکی* مقـاوم بـه ایزوله‌های حساس باکتری اشاره کـرد. مطالعـات بسـیار محـدودی در زمینـه شـیوع مقاومـت آنتـی‌بیـوتیکی ایزولـه‌هـای *کرونوبـاکتر سـاکازاکی* جداسـازی شـده از نمونه‌های شیر خشـک و غـذای نـوزاد انجـام پذیرفتـه است. ایزوله‌های *کرونوباکتر ساکازاکی* بـه طـور معمـول به آنتی‌بیوتیک‌های آمپـی سـیلین، آمینوگلایکوزیـدها، کلرامفنیکـل، تتراسـایکلین، نالیدیکسـیک اسـید و کاربنیسیلین حساس هستند. در اولـین بررسـی‌هـا کـه انجام پذیرفت حساسیت بالای ایزولـه‌هـای *کرونوبـاکتر ساکازاکی* نسبت به آنتـی‌بیوتیـک‌هـای آمپـی سـیلین، سـفالوتین، جنتامایسـین، توبرامایسـین، کلرامفنیکـل و کانامایسین گزارش شد. بررسی‌های بعدی نشان دهنده حساسیت نسبی جدایه‌های *کرونوباکتر ساکازاکی* نسبت به آنتی‌بیوتیک سفالوتین بود. مطالعات انجـام شـده در سـال‌هـای بعـد نشـان‌دهنـده حساسـیت ایزولـه‌هـای *کرونوبـاکتر سـاکازاکی* نسـبت بـه آنتـی‌بیوتیـک‌هـای جنتامایسین، کلرامفنیکل، آمپـی‌سـیلین و کانامایسـین بـود (Farmer et al. 1980; Monroe and Tift, 1979). ۸ ایزوله *کرونوباکتر ساکازاکی* جداسازی شـده از نمونه‌های بالینی و ۵ ایزوله جداسـازی شـده از مـواد غـذایی نسـبت بـه آنتـی‌بیوتیـک‌هـای آمپـی‌سـیلین، جنتامایسـین، کلرامفنیکـل، کانامایسـین، سفوتاکسـیم، تتراسـایکلین، استرپتومایسـین، پلـی میکسـین B و تری‌متوپریم و سولفامتوکسازول حساس امـا نسـبت بـه آنتی‌بیوتیک‌های سـفالوتین و سولفیسوکسـازول مقـاوم بودند(Farber and, Nazarowec-White 1999). در این بررسی ۳ ایزوله *کرونوباکتر ساکازاکی* جـدا شـده از مـواد غـذایی عـلاوه بـر مقاومـت بـه سـفالوتین و سولفیسوکسازول، نسبت به کلرامفنیکل، آمپی‌سیلین و تتراسایکلین نیز مقاوم بودند. در مطالعـه (Kuzina et al., 2001) نتایج نشان داد که ایزوله‌هـای *کرونوبـاکتر ساکازاکی* جداسـازی شـده از مـواد غـذایی نسـبت بـه آنتی‌بیوتیک‌های سفالوتین و آمپی‌سیلین مقاوم بودنـد. در مطالعه دیگـری ایزولـه‌هـای *کرونوبـاکتر سـاکازاکی* جداسـازی شـده از مـواد غـذایی نسـبت بـه آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، سفازولین و پنـی‌سـیلین مقـاوم بودنـد(Lai, 2001). در مطالعـه (Kim et al., 2008). الگـوی مقاومـت آنتـی‌بیـوتیکی ۱۱۳ ایزولـه *کرونوباکتر ساکازاکی* جداسازی شده از انواع مواد غذایی از جمله شیر خشـک و غـذای کـودک اثبـات شـد کـه میزان مقاومـت آنتـی‌بیـوتیکی ایزولـه‌هـای *کرونوبـاکتر ساکازاکی* جداسـازی شـده از مـواد غـذایی نسـبت بـه آمپی‌سیلین، سفالوتین و کلرامفنیکل بـه ترتیـب ۳۱/۸، ۵/۳ و ۱۱/۵ درصد بود که از نتایج ایـن تحقیـق کمتـر بـود. در مطالعـه ای کـه توسـط شـکری و همکـاران (۱۳۹۴) انجام پذیرفت، میزان مقاومـت آنتـی‌بیـوتیکی ایزولـه‌هـای انتروبـاکتر بـر علیـه آنتـی‌بیوتیـک‌هـای آمپـی‌سـیلین، تازوسـین، سـفتازیدیم، سفوتاکسـیم، ایمی‌پـنم، مـروپنم، ارتـاپنم، دوری‌پـنم، جنتامایسـین، آمیکاسین، سیپروفلوکسازین، نیتروفورانتوئین و سـفپیم به ترتیب ۹۴/۲، ۲۰، ۶۲/۸، ۶۸/۵، ۸/۶، ۸/۶، ۸/۶، ۸/۶، ۶۲/۸، ۲۸/۶، ۶۰، ۱۷/۱ و ۳۴/۳ درصد بود. در مطالعـه دیگری از کل ۵۵ نمونه انواع شـیر و فـرآورده‌هـای آن، ۳۰۰ ایزوله *کرونوباکتر ساکازاکی* جداسازی شـد کـه ۵ ایزولـه آن از نظـر بیوشـیمیایی بـه عنـوان *کرونوبـاکتر ساکازاکی* شناخته شدند. میزان حساسـیت ایزولـه‌هـای *کرونوبـاکتر سـاکازاکی* نسـبت بـه آنتـی‌بیوتیـک‌هـای سیپروفلوکسـازین، ریفـامپین، جنتامایسـین، اسپکتینومایسـین، ونکومایسـین، توبرامایسـین، آموکسـی‌سـیلین، میموسـایکلین، سـفتی‌راکسـون و

سفتازیدیم به ترتیب ۱۰۰، ۰، ۱۰۰، ۱۰۰، ۰، ۸۰، ۴۰، ۴۰، ۱۰۰ و ۶۰ درصد گزارش گردید. هم‌چنین اثر اسانس‌های گیاهی بر ایزوله‌های *کرونوباکتر ساکازاکی* مورد ارزیابی قرارگرفت (Prakash and Sharma, 2013).

نتیجه گیری

در کل با توجه به شیوع بالای ایزوله‌های *کرونوباکتر ساکازاکی* مقاوم آنتی‌بیوتیک در نمونه‌های شیر خشک نوزاد و غذای کودک در بررسی حاضر می‌توان نتیجه گرفت که: ایزوله‌های جدا شده احتمالاً در اثر آلودگی‌های متقاطع به نمونه‌های شیر خشک نوزاد و غذای کودک منتقل شده اند. در نتیجه رعایت اصول بهداشتی، پوشیدن دستکش و روپوش تمیز و استفاده از ماسک استریل به همراه اخذ آزمون مدفوعی بهداشتی ماهانه یا سالانه از پرسنل کارخانجات و مراکز تولید الزامی است و بهتر است شیر خشک نوزاد و غذای کودک تا حد امکان از برندهای معروف و معتبرتر که دارای تأییدیه بهداشتی هستند و امکان آلودگی آن‌ها کمتر است تهیه شود.

منابع

۱. اسداللهی دهکردی،آذر.،مشتاقی بروجنی،حمدالله‌و حسینی،سیدسهام.(۱۳۹۳).تشخیص *انتروباکترساکازاکی* درشیرخشک نوزادبه‌روش‌های میکروبیولوژی و مولکولی نخستین‌کنفرانس ملی توسعه کیفیت راهبردی فراگیر در سلامت غذا. تهران،انجمن مدیریت کیفیت ایران. ۳-۲ اردیبهشت ۹۳، صفحه۱۲.

۲. شکری،داریوش.،مباشری‌زاده،سینا.، فاطمی، سید مسیح.، مویدنیا، رضا و صادقی نایینی، مهسا. (۱۳۹۴). پایش بیمارستانی مقاومت باکتری‌های *انتروباکتر و اشریشیا کلای* نسبت به کارباپنم‌ها در سویه‌های دارای مقاومت دارویی چندگانه در شهر اصفهان. مجله دنیای میکروب‌ها، سال هشتم، شماره ۱، صفحه ۷۵-۶۴.

۳. سازمان ملی استاندارد ایران (۱۳۸۶). شیر و فراورده‌های آن: روش جستجو و شناسایی *انتروباکتر ساکازاکی*. چاپ اول. استاندارد شماره ۹۴۳۰.

4. CLSI. 2011. Clinical and Laboratory Standards Institute. Standards for antimicrobial. Susceptibility testing;Twenty-first international supplement. M100-S21. 31:1.
5. Estuningsih, S., Kress, C., Hassan, A.A., Akineden, O., Schneider, E., and Usleber, E. 2006. Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula manufactured in Indonesia and Malaysia. J. Food Prot. 69: 3013-3017.
6. Farmer, J.J., Asbury, M.A., Hickman, F.W., Brenner, D.J., and Enterobacteriaceae study group. 1980. *Enterobacter sakazakii*: A new species of "Enterobacteriaceae" isolated from clinical specimens. Int J Syst Bacteriol. 30 (3): 569–584.
7. FSAI. 2007. Food Safety Authority of Ireland. Information relevant to the development of guidance material for the safe feeding of reconstituted powdered infant.
8. Iversen, C., and Forsythe, S. 2004. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from powdered infant formula milk and related products. Food Microbiol. 21(6):771-777.
9. Keyser, M., Witthuhn, R.C., Ronquest, L.C., and Britz, T.J. 2003. Treatment of winery effluent with upflow anaerobic sludge blanket (UASB)--granular sludges enriched with Enterobacter

sakazakii. Biotechnol Lett. 25(22):1893-1898.

10. Kim, K., Jang, S.S., Kim, S.K., and Ryu, S. 2008. Prevalence and genetic diversity of Enterobacter sakazakii in ingredients of infant foods. Int. J. Food Microbiol. 122(1-2): 196-203.
11. Kuzina, L.V., Peloquin, J.J., Vacek, D.C., and Miller, T.A. 2001. Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, Anastrepha ludens (Diptera: Tephritidae). Curr Microbiol. 42, 290-294.
12. Lai, K.K. 2001. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults: case reports and a review of the literature. Medicine. 80, 113-122.
13. Mardaneh, J., and Soltan-Dallal, M. M. 2014. Isolation and Identification of E. cowanii from Powdered Infant Formula in NICU and Determination of Antimicrobial Susceptibility of Isolates. Iran J Pediatr. 24, 261.
14. Monroe, P.W., and Tift, W. 1979. Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow, pigmented Enterobacter cloacae). J. Clin. Microbiol. 10, 850-851.
15. Muytjens, H.L., Roelofs-Willemse, H., and Jaspar, G. 1988. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 26, 743-746.
16. Nazarowec-White, M., and Farber, J. 1999. Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of Enterobacter sakazakii. J Med Microbiol. 48, 559-567.
17. Nazarowec-White, M., and Farber, J.M. 1997. Incidence, survival, and growth of Enterobacter sakazakii in infant formula. J. Food Prot. 60, 226-230.
18. Shaker, R.S., Osaili, T., Al-Omary, W., and Al-Zuby, M. 2007. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacter sp. from food and food production environments. Food Control 18(10):1241–1245.
19. Sharma, G., and Prakash, A. 2013. Susceptibility of Cronobacter sakazakii to plant products, antibiotics, and to lactic acid bacteria. Int. J Nutr. Pharmacol. Neurol. Dis. 3(3):263-268.
20. Zink, D. 2003. FDA field survey of powdered formula manufacturing. In FDA Food Advisory Committee. Contaminants and natural toxicants subcommittee meeting: *Enterobacter sakazakii* contamination in powdered infant formula. Washington DC. 18-19

The Study on antibiotic resistance pattern of *Cronobacter sakazakii* strains isolated from infant formula and baby food types

Abbasi bafetrat S[1], Goli M[2*], Momtaz H[3]

1. M.S. Graduated of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

3. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

***Corresponding author:** *m.goli@khuisf.ac.ir., mgolifood@yahoo.com*

Received: 14 June 2016 Accepted : 5 Feb 2017

Abstract

Cronobacter sakazakii is one of the main pathogens that transmitted by feeding infants by contaminated infant formula and baby-food. This bacterium is one of the major causes of mortality, digestive diseases and meningitis in newborns. This study was performed in order to detect microbiological and molecular contamination by *Cronobacter sakazakii* and study antibiotic resistance pattern of bacterial isolates. Two hundred samples of infant formula and baby food from deferent brands were collected and after microbial detection, bacteria's isolates were detected, using PCR method. Then antibiotic resistance pattern of isolates were evaluated using disk diffusion method. Three samples from total 100 baby food (3%) and 5 samples from total 100 infant formula (5%) had *Cronobacter sakazaki* infection. A, B and C brands from infant formula and A, D brands from baby food were contaminated with *Cronobacter sakazakii.* B and C brands from infant formula (10% each of them) and A brand from baby food (8%) were infected with *Cronobacter sakazakii.* Isolates from *Cronobacter sakazakii* which isolate from infant formula and baby food demonstrated most Sensitivity to ciprofloxacin (20.38), meropenem (19.83) and imipenem (19.63) and most resistance to amoxicillin, ampicillin, tigecycline, ticarcillin, aztreonam and ceftazidime. Careful inspection on the raw material quality of infant formula and baby food as well as, exact supervision on production procedure, sanitation in addition to use natural antimicrobial can reduce Prevalence rate of this bacteria.

Keywords: *Cronobacter sakazakii*, Baby food, Infant formula, Antibiotic resistance pattern.