

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

سمیرا عباسی بافطرت^۱، محمد گلی^{۲*}، حسن ممتاز^۳

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@khuhsf.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۲۵

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 جمع‌آوری 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 ایمپنم (۱۹/۶۳) و بیشترین مقاومت را به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، 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 میکروب‌های طبیعی از میزان شیوع آلودگی به این باکتری می‌کاهد.

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

مقدمه

ساکازاکی از باکتری‌های خانواده *انتروباکتریاسه*، یک باکتری گرم منفی، میله‌ای راست، هوازی-بی‌هوازی اختیاری، متحرک، دارای تازک‌های 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

شیر خشک و غذای نوزاد به راحتی در دسترس است و به عنوان یک مکمل یا جایگزین شیر مادر می‌باشد. شیر خشک نوزاد در طول فرایند تولید، حرارت داده می‌شود اما حرارتی که در طول تولید این محصول اعمال می‌شود به اندازه‌ای نیست که محصولی سترون تولید شود، لذا این محصول توسط اقدامات بهداشتی سخت‌گیرانه همراه با نظارت بر شرایط محیطی تولید می‌شود. این فعالیت‌ها به کاهش بار میکروبی شیر خشک نوزاد کمک می‌کند (Estuningsih, 2006; Iversen and Forsythe, 2004). کرونوباکتر

میکروارگانسیم 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 آنتی‌بیوتیک‌های 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

نمونه‌ها و جداسازی باکتری

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۱۰۰ نمونه از ۸ برند تجارتي شیر خشک نوزاد و ۱۰۰ نمونه غذای کودک از ۴ برند مختلف عرضه شده در داروخانه‌های شهر اصفهان، خریداری شد. برای هر نمونه برداری، 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 انتروباکتر ساکازاکی (ESIA)، تریپتون سویا آگار (TSA) و تست های تائیدی اکسیداز، تخمیر کربوهیدرات 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

توانایی تولید آنزیم داکسی ریبونوکلاز 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 معمولاً عامل آلودگی ثانوی به شمار می‌آید (et al., 2007). سببی سمی، مننژیت، 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

میکرولیتر از زوج پرایمرها، ۱ واحد آنزیم Taq DNA پلیمرز 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 تصویربرداری از ژل (Uvi-tech. U. K.) قرائت گردید.

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 سلیسیوس 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 کروموباکتر 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

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی کروموباکتر ساکازاکی

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

Tigecycline (15 µg/disk), Tetracycline (30 µg/disk), Ticarcillin (30 µg/disk), Chloramphenicol (30 µg/disk), Cefotaxime (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).

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 کاملاً پیوسته در محیط جامد مولر هینتون آگار 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), Meropenem (10 µg/disk), Mezlocillin (30 µg/disk), Nalidixic acid (30 µg/disk),

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 بررسی های آماری انجام پذیرفت و در مقادیر $P < 0.05$ تفاوت معنی دار شناخته شد.

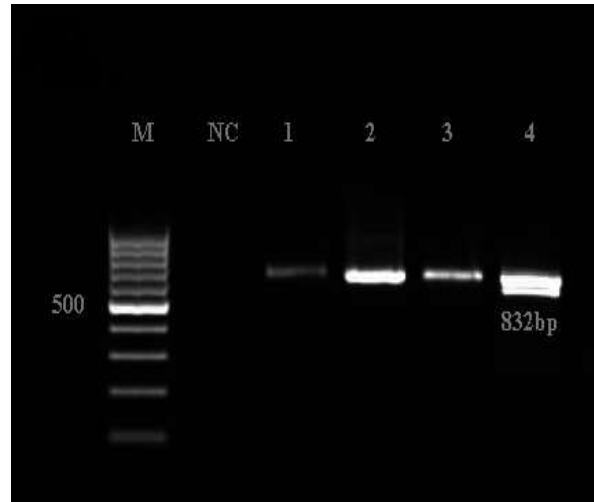
نتایج

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 نمونه های 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 نمونه های شیر خشک و غذای کودک را نمایش می دهد.

جدول ۲- فراوانی آلودگی با کرونوباکتر ساکازاکی در نمونه های شیر خشک نوزاد و غذای کودک

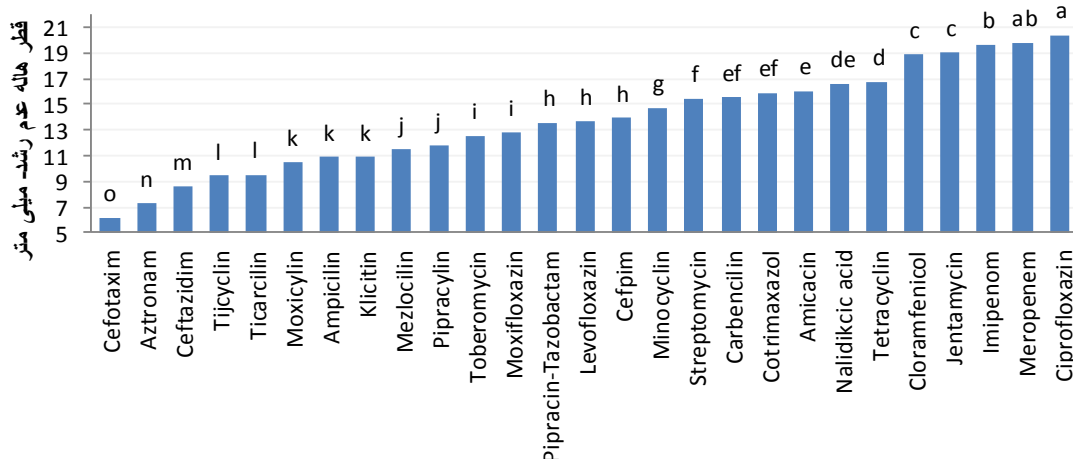
نوع نمونه/برند تجاری	تعداد نمونه جمع آوری شده	تعداد نمونه های آلوده	فراوانی کرونوباکتر ساکازاکی (%)
A	۱۶	۱	۶/۲۵
B	۲۰	۲	۱۰
C	۲۰	۲	۱۰
D	۱۰	۰	۰
E	۸	۰	۰
F	۸	۰	۰
G	۸	۰	۰
H	۱۰	۰	۰
کل	۱۰۰	۵	۵
A	۲۵	۲	۸
B	۲۵	۰	۰
C	۲۵	۰	۰
D	۲۵	۱	۴
کل	۱۰۰	۳	۳
کل	۲۰۰	۸	۴



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

(۱۹/۸۳) و ایمپنم (۱۹/۶۳) داشتند که از نظر آماری تفاوت معنی‌دار با یکدیگر نداشتند در صورتی که با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند (سطح ۰/۵). کرونیوباکتر ساکازاکی به این آنتی‌بیوتیک‌ها بیشترین حساسیت را نشان داد و رشد این باکتری را به میزان زیادی کاهش می‌دهد. ایزوله‌های کرونیوباکتر 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 آنتی‌بیوتیک‌های تیجسیکلین و تیکارسیلین نسبت به هم نیز مشاهده می‌شود. میزان قطر هاله عدم رشد ایزوله‌های کرونیوباکتر ساکازاکی نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها در حد متوسط بود.

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های کرونیوباکتر ساکازاکی
الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۸ ایزوله کرونیوباکتر ساکازاکی جداسازی شده از نمونه‌های شیر خشک نوزاد و غذای کودک مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که قطر هاله عدم رشد ایزوله کرونیوباکتر 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 کرونیوباکتر ساکازاکی دارد (در سطح ۰/۵). نتایج نشان داد که ایزوله‌های کرونیوباکتر 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



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

بحث

بررسی تشخیص کرونوباکتر ساکازاکی
بررسی حاضر به منظور تشخیص کرونوباکتر ساکازاکی در انواع شیر خشک و غذای کودک و ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی 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 می‌توان 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، آلودگی‌های متقاطع نمونه‌های شیر خشک و غذای کودک در

گونه‌های کرونوباکتر از جمله پاتوژن‌های فرصت طلب هستند، که میزان مرگ و میر ناشی از آن‌ها ۴۰ تا ۸۰ درصد برآورد شده است. این عوامل بیماری‌زا می‌توانند طیف وسیعی از بیماری‌های مهلک مانند مننژیت، سیتیسمی، انتروکولیت نوزادان، و آبسه‌های مغزی را ایجاد کنند. اگرچه کرونوباکترها می‌توانند عامل بیماری در بزرگسالان و کودکان باشند اما عفونت‌های نوزادان در ارتباط با شیر خشک نوزاد و غذای کودک بیش از سایر موارد دیده می‌شود. از آن‌جا 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 داروخانه‌ها جمع‌آوری 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 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 نکروران منژیت 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 نمونه های 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

کارخانه پس از اعمال حرارت لازم برای از بین بردن پاتوژن های احتمالی، عدم درزبندی مناسب قوطی های شیر خشک و بسته بندی های 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 فرآورده ها، در این زمینه مطالعات بسیار کمی انجام پذیرفته است: در تنها مطالعه ای که در ایران به منظور تشخیص کرونوباکتر ساکازاکی در نمونه های شیر خشک نوزاد انجام پذیرفته است (اسداللهی دهکردی و همکاران، ۱۳۹۳) در کل ۳۰۰ نمونه از ۷ برند تجاری شیر خشک نوزاد عرضه شده در داروخانه ها 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 کاملاً مغایرت دارد. احتمالاً حساسیت و ویژگی متفاوت پرایمرهای استفاده شده در بررسی پیشین دلیل اصلی عدم توانایی آزمون PCR در تشخیص صحیح ایزوله های کرونوباکتر ساکازاکی جداسازی شده به روش کشت بوده است. در این

نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که ایزوله‌های کرونوباکتر ساکازاکی جدا شده از غذای کودک و شیر خشک نوزاد بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد در هنگام استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکسازین (۲۰/۳۸)، مروپنم (۱۹/۸۳) و ایمپی پنم (۱۹/۶۳) داشتند. کرونوباکتر ساکازاکی به این آنتی‌بیوتیک‌ها 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 آنتی‌بیوتیک‌ها 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 می‌توان به تجویز بی‌رویه آنتی‌بیوتیک در فارم‌های حیوانات توسط دامپزشکان و احتمالاً انتقال سوش‌های مقاوم و یا ژن‌کدکننده 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 آنتی‌بیوگرام 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

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 مطالعه‌ای 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 $0.36/100g$ CFU 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 نمونه‌ها $0.36/100g$ CFU برآورد گردید که بسیار قابل توجه بود (Nazarowec-White and Farber, 1997). میزان شیوع کرونوباکتر ساکازاکی در نمونه‌های غذای کودک جمع‌آوری شده از نقاط مختلف کشور هلند ۱۴/۲ درصد بود و میانگین سطح آلودگی نمونه‌ها $0.66/100g$ CFU بود (Muytjens et al., 1988).

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های کرونوباکتر ساکازاکی جدا شده از غذای کودک و شیر خشک نوزاد

تتراسایکلین نیز مقاوم بودند. در مطالعه (Kuzina et al., 2001) نتایج نشان داد که ایزوله‌های *کرونیباکتر ساکازاکی* جداسازی شده از مواد غذایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفالوتین و آمپی‌سیلین مقاوم بودند. در مطالعه دیگری ایزوله‌های *کرونیباکتر ساکازاکی* جداسازی شده از مواد غذایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، سفازولین و پنی‌سیلین مقاوم بودند (Lai, 2001). در مطالعه (Kim et al., 2008)، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۱۱۳ ایزوله *کرونیباکتر ساکازاکی* جداسازی شده از انواع مواد غذایی از جمله شیر خشک و غذای کودک اثبات شد که میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *کرونیباکتر ساکازاکی* جداسازی شده از مواد غذایی نسبت به آمپی‌سیلین، سفالوتین و کلرامفنیکل به ترتیب ۳۱/۸، ۵/۳ و ۱۱/۵ درصد بود که از نتایج این تحقیق کمتر بود. در مطالعه ای که توسط شکری و همکاران (۱۳۹۴) انجام پذیرفت، میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *انتروباکتر بر* علیه آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، تازوسین، سفوتازیدیم، سفوتاکسیم، ایمی‌پنم، مروپنم، ارتاپنم، دوری‌پنم، جنتامایسین، آمیکاسین، سیپروفلوکسازین، نیتروفورانتوئین و سفپیم 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 مطالعه دیگری از کل ۵۵ نمونه انواع شیر و فرآورده‌های آن، ۳۰۰ ایزوله *کرونیباکتر ساکازاکی* جداسازی شد که ۵ ایزوله آن از نظر بیوشیمیایی به عنوان *کرونیباکتر ساکازاکی* شناخته شدند. میزان حساسیت ایزوله‌های *کرونیباکتر ساکازاکی* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکسازین، ریفامپین، جنتامایسین، اسپکتینومایسین، ونکومایسین، توپرامایسین، آموکسی‌سیلین، میموسایکلین، سفتری‌راکسون و

پیشین بیماری و انتقال ژن کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی از ایزوله *کرونیباکتر ساکازاکی* مقاوم به ایزوله‌های حساس باکتری اشاره کرد. مطالعات بسیار محدودی در زمینه شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *کرونیباکتر ساکازاکی* جداسازی شده از نمونه‌های شیر خشک و غذای نوزاد انجام پذیرفته است. ایزوله‌های *کرونیباکتر ساکازاکی* به طور معمول به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، آمینوگلایکوزیدها، کلرامفنیکل، تتراسایکلین، نالیدیکسیک اسید و کاربنیسیلین حساس هستند. در اولین بررسی‌ها که انجام پذیرفت حساسیت بالای ایزوله‌های *کرونیباکتر ساکازاکی* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، سفالوتین، جنتامایسین، توپرامایسین، کلرامفنیکل و کانامایسین گزارش شد. بررسی‌های بعدی نشان دهنده حساسیت نسبی جدایه‌های *کرونیباکتر ساکازاکی* نسبت به آنتی‌بیوتیک سفالوتین بود. مطالعات انجام شده در سال‌های بعد نشان‌دهنده حساسیت ایزوله‌های *کرونیباکتر ساکازاکی* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، کلرامفنیکل، آمپی‌سیلین و کانامایسین بود (Farmer et al. 1980; Monroe and Tift, 1979). ۸ ایزوله *کرونیباکتر ساکازاکی* جداسازی شده از نمونه‌های بالینی و ۵ ایزوله جداسازی شده از مواد غذایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، جنتامایسین، کلرامفنیکل، کانامایسین، سفوتاکسیم، تتراسایکلین، استرپتومایسین، پلی میکسین B و تری‌متوپریم و سولفامتوکسازول حساس اما نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفالوتین و سولفیسوکسازول مقاوم بودند (Farber and, Nazarowec-White 1999). در این بررسی ۳ ایزوله *کرونیباکتر ساکازاکی* جدا شده از مواد غذایی علاوه بر مقاومت به سفالوتین و سولفیسوکسازول، نسبت به کلرامفنیکل، آمپی‌سیلین و

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.

سفت‌زیدیم به ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰، ۱۰۰، ۱۰۰، ۸۰، ۴۰، ۴۰ و ۶۰ درصد گزارش گردید. هم‌چنین اثر اسانس‌های گیاهی بر ایزوله‌های کروموباکتر ساکازاکی مورد ارزیابی قرار گرفت (Prakash and Sharma, 2013).

نتیجه گیری

در کل با توجه به شیوع بالای ایزوله‌های کروموباکتر ساکازاکی مقاوم آنتی‌بیوتیک در نمونه‌های شیر خشک نوزاد و غذای کودک در بررسی حاضر می‌توان نتیجه گرفت که: ایزوله‌های جدا شده احتمالاً در اثر

منابع

1. اسداللهی دهکردی، آذر، مشتاقی بروجنی، حمدالله و حسینی، سیدسهم (۱۳۹۳). تشخیص/انتروباکتر ساکازاکی در شیر خشک نوزاد به روش‌های میکروبیولوژی و مولکولی نخستین کنفرانس ملی توسعه کیفیت راهبردی فراگیر در سلامت غذا. تهران، انجمن مدیریت کیفیت ایران. ۳-۲ اردیبهشت ۹۳، صفحه ۱۲.
2. شکری، داریوش، مباشری زاده، سینا، فاطمی، سید مسیح، مویدنیا، رضا و صادقی نایینی، مهسا. (۱۳۹۴). پایش بیمارستانی مقاومت باکتری‌های انتروباکتر و اشریشیا کلای نسبت به کاربامپن‌ها در سویه‌های دارای مقاومت دارویی چندگانه در شهر اصفهان. مجله دنیای میکروب‌ها، سال هشتم، شماره ۱، صفحه ۶۴-۷۵.
3. 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*

- 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 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

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

Abbasi bafetrat S¹, Goli M^{2*}, Momtaz H³

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.