Research Paper

Cronobacter Sakazakii: A Foodborne Pathogenic Bacterium in Immunocompromised and Hospitalized Patients

Jalal Mardaneh[1*]

1. Department of Microbiology, Infectious Diseases Research Center, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Mardaneh J. [Cronobacter *Sakazakii*: A Foodborne Pathogenic Bacterium in Immunocompromised and Hospitalized Patients (Persian)]. Quarterly of "The Horizon of Medical Sciences". 2021; 27(2):264-287. https://doi.org/10.32598/hms.27.2.1402.4

https://doi.org/10.32598/hms.27.2.1402.4

CC BY NC

Received: 25 Nov 2019
Accepted: 12 Mar 2021
Available Online: 01 Apr 2021

Key words:
Foodborne pathogen, *Cronobacter sakazakii*, Neonates, Hospitalized patients, Infections, Prevention strategies

ABSTRACT

Aims *Cronobacter sakazakii* (CS) is a member of the Enterobacteriaceae family. It is a genomically heterogeneous, motile, Gram-negative bacillus. It is also an emergent foodborne pathogen associated with the ingestion of infant formula milk that can cause neonatal sepsis, necrotizing enterocolitis, and meningitis. This review is focused on the newest information about the bacterial characteristics of *C. sakazakii* and human infections causing by this pathogenic bacterium.

Methods & Materials We searched medical databases such as ISI Web of Science, PubMed, Scopus, and other websites.

Findings *Cronobacter sakazakii* acts as a microbiological hazard in the infant food chain, with historic high mortality in neonates. The International Commission for Microbiological Specifications for Foods has categorized *C. sakazakii* as a severe hazard bacterium for some individuals, with long duration, substantial chronic sequelae, or life-threatening complications. Although the incidence of *C. sakazakii* infection is low, the prognosis of the disease is poor, and infection is associated with significant morbidity and mortality. Powdered Infant Formula (PIF) milk products contaminated with *C. sakazakii* have been epidemiologically linked to several clinical cases. Premature infants, low-birth-weight ones, and patients hospitalized in the Neonatal Intensive Care Units (NICUs) are more at infection risk than older infants.

Conclusion We recommend focusing on simple preventative strategies such as the promotion of breast milk feeding, the inclusion of warnings on the powder infant formula packages that may be contaminated with *C. sakazakii*, and abstinence from the practice of re-warming of reconstituted formula. Reconstituted dairy products should be avoided in adult immunosuppressed populations. Appropriate barrier precautions should be observed in NICU and intensive care unit settings, where the spread of infection may be more prevalent.

English Version

1. Introduction

History

Cronobacter sakazakii is one of the Enterobacteriaceae family members characterized as a new bacterial species in 1980. Initially, it was identified as an opportunistic pathogen responsible for meningitis and sepsis in neonates [1, 2]. *C. sakazakii* is of genus *Cronobacter* and is a genomically heterogeneous, motile (by flagella), and Gram-negative rod bacterium [1]. The bacterium was firstly named as "yellow-pigmented cloacae", and categorized as "*Enterobacter sakazakii*" in 1980, considering the diversity in antibiotic susceptibility profiles,

* ***Corresponding Author:***
Jalal Mardaneh, PhD.
Address: Department of Microbiology, Infectious Diseases Research Center, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran.
Tel: +98 (917) 1892158
E-mail: jalalmardaneh@yahoo.com

www.SID.ir

pigment production, DNA-DNA hybridization, biochemical reactions, compared with *Enterobacter cloacae* [3]. By DNA-DNA hybridization method, *C. sakazakii* has been reported to be 50% associated with *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter koseri*. Also, *C. sakazakii* produces brain abscesses similar to those caused by *C. koseri* [4].

In 1980, Farmer and colleagues determined the species and illustrated 15 biogroups based on the biochemical patterns. A defining characteristic has been the activity of the α-glucosidase enzyme [5]. As a result, selective differential media incorporating chromogenic or fluorogenic α-glucosides such as the indolyl substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-α, D-glucopyranoside have been presented [5, 6]. Lately, 16S rDNA sequencing has shown that biochemical diagnostic kits recognized more than one species as *C. sakazakii* with at least four biochemically and genetically separate subgroups [5, 7, 8].

Nomenclature

Cronobacter sakazakii constitutes a microbiological hazard in the infant food chain, with historically high mortality in neonates. It has been described since early 1929 when it was characterized by producing a yellow culture and causing septicemia in infants. The name *Cronobacter* was appropriately derived from Greek mythology. *Cronobacter sakazakii* comb. nov., was named in honor of the Japanese microbiologist Riichi Sakazaki when the species was first defined in 1980 as *Enterobacter sakazakii*. Hence, *Cronobacter* gen. nov. was proposed after the Greek mythological god, Cronus, who swallowed his children at birth [9]. Cronus was the son of Uranus (Heaven) and Gaea (Earth), the youngest of the 12 Titans. He eventually became the king of the Titans and took for his consort his sister Rhea. Rhea bore him several children, including Hestia, Demeter, Hera, Hades, and Poseidon. Cronus, however, had been previously warned by his parents that he would be overthrown by his own child. Then, he swallowed all those children. When Zeus was born, however, Rhea hid him in Crete and tricked Cronus into swallowing a stone instead. Zeus grew up, forced Cronus to disgorge his brothers and sisters, waged war on Cronus, and was victorious [10].

C. sakazakii was previously known as a "yellow-pigmented *Enterobacter cloacae*" until 1980. It was first classified as a novel species in 1980 when it was introduced as a new species based on differences in biochemical reactions, DNA-DNA hybridization, and antibiotic susceptibility patterns [11-14].

Analysis of both partial 16S rDNA and hsp60 sequences showed that *C. sakazakii* isolates formed at least four distinct clusters, and it was proposed that clusters 2, 3, and 4 could be unique species. Based on DNA-DNA hybridization and phenotyping, *Enterobacter sakazakii* was subsequently proposed to be re-classified into a new genus *Cronobacter*, composed of five distinct species: *Cronobacter sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii, and C. dublinensis*. Because of their close relatedness, *C. sakazakii* and C. malonaticus are difficult to distinguish by 16S rDNA sequence analysis [15, 16].

In 2007, different microorganisms were classified in the *Cronobacter* genus, including four named species, one unnamed species, and five named subspecies: *C. sakazakii* subspecies *sakazakii*, *C. sakazakii* subspecies malonaticus, *C. dublinensis* subspecies dublinensis, *C. dublinensis* subspecies lactaridi, *C. dublinensis* subspecies lausanensis, *C. muytjensii*, *C. turicensis*, *C. genomospecies* 1 (a distinct species, but unnamed) [17, 18].

Genome and classification

Cronobacter is a Gram-negative member of the Enterobacteriaceae family. It is rod-shaped and motile by peritrichously flagellated. The bacterium was known as *Enterobacter sakazakii* in 1980, differentiated from *Enterobacter cloacae* regarding its antibiotic susceptibility profiles, pigment production, biochemical reactions, and DNA-DNA hybridization [19]. Subsequently, *Enterobacter sakazakii* was identified as a more taxonomically complex and genetically diverse species than earlier thought, and consequently, an extensive poly-phasic survey led to the proposal of the new genus *Cronobacter*, affording species status to several biogroups of *Enterobacter sakazakii* [20]. The *Cronobacter* genus consists of six species: *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter* malonaticus, *Cronobacter* turicensis, *Cronobacter* muytjensii, *Cronobacter dublinensis*, and *Cronobacter genomospecies* 1, to accommodate the biogroups of the hitherto known *C. sakazakii* [19, 20].

Morphology

Cronobacter sakazakii (ubiquitous and opportunistic pathogen) is a member of the Enterobacteriaceae family. It is a Gram-negative, rod-shaped bacterium measuring approximately between 3 and 1 µm in size and is peritrichously or highly flagellated, thus being motile. It can produce a protective biofilm, too [2, 21].

Metabolism and growth

Strains in the *Cronobacter* genus are described as catalase positive, oxidase negative, and facultative anaerobic. Sub-

www.SID.ir

strates used for energy production include amino acids and various lipophilic molecules, sugars, and nitrates in nitrate reduction reactions [22].

Although the optimum temperature for growth of *C. sakazakii* is 39°C; the temperature range for the growth of *Cronobacter* is 6°C to 45°C, with an optimal range of 37°C to 43°C. *Cronobacter* is the most thermo-tolerant member among the Enterobacteriaceae family. Some *Cronobacter* strains can grow at 47°C and slowly at household refrigeration temperatures. This bacterium can grow below 4°C, indicating that this species would replicate even during refrigeration [23].

Infections caused by *Cronobacter sakazakii*

Cronobacter sakazakii is a foodborne pathogen associated with the ingestion of IFM that can cause neonatal sepsis, meningitis, and necrotizing enterocolitis. *C. sakazakii* has been categorized as a severe hazardous bacterium for some individuals, with long duration, substantial chronic sequelae, or life-threatening complications [24].

Cronobacter sakazakii is considered an opportunistic organism and an etiological agent of life-threatening diseases in infant groups. Although the incidence of *C. sakazakii* infection is low, the prognosis of the disease is poor, and infection is associated with significant morbidity and mortality. Powdered Infant Formula (PIF) milk products contaminated with *C. sakazakii* have been linked to several clinical cases [3].

The important infections caused by *Cronobacter sakazakii* in infants are necrotizing enterocolitis, septicemia, and life-threatening meningitis. Low-birth-weight and premature infants and those aged >28 days are more at infection risk than older ones. Clinical manifestations and outcomes include bloodstream infection, necrotizing enterocolitis, meningitis, developmental delay, cyst formation, seizures, brain abscess, hydrocephalus, ventriculitis, and death in 40%–80% of the cases [25-27]. The mortality rate of Necrotizing Enterocolitis (NEC) caused by *Cronobacter sakazakii* is about 40% to 100% in the most severely affected patients. This infection is the most common gastrointestinal surgical emergency in affected neonates [3].

In neonatal populations, *Cronobacter sakazakii* infection outbreaks have been related to [infant formula milk. Most patients who survive *C. sakazakii* meningitis suffer from severe neurologic sequelae, including development retardation, quadriplegia, and hydrocephalus [28]. Fecal carriage of *C. sakazakii* has been reported in patients as old as 18 weeks of age, showing the potential for adherence to the mucosal membrane and long-term colonization of the human intestine by this organism and supporting the need for the isolation of infected patients. Neonatal enterocolitis is associated with enteral feeding, intestinal prematurity, and microbial colonization. The infection affects roughly 13% of those with birth weights 1.5 - 2 kg and 5% of all preterm (premature) infants [28, 29].

In children

Cronobacter sakazakii infections continue to be more common in infants and neonates, usually associated with a poor prognosis. Mortality rates of 33% to 80% have been reported [30]. Also, morbidity in *C. sakazakii* infections is significant. Most children who survive Enterobacter-associated meningitis (94%) develop irreversible neurological sequelae resulting in quadriplegia, developmental delay, and impaired sight and hearing. These complications are frequently attributed to secondary cerebral infarcts. Although premature low-birth-weight infants are at higher risks, *C. sakazakii* infection has been shown in normal and immunocompromised adults. Some outbreaks of bacterial infection in Neonatal Intensive Care Units (NICUs) have been attributed to powdered formula contaminated with *Cronobacter* [30, 31].

Infections caused by *Cronobacter* are mostly associated with sporadic cases of life-threatening diseases, in particular septicemia, NEC, and meningitis in infants. Infants under 28 days of age and neonates with low birth weight (i.e., < 2.5 kg) are at heightened risk compared to more mature counterparts [19]. Various infections include bloodstream infections, NEC characterized by intestinal necrosis and pneumatosis intestinalis, meningitis leading to ventriculitis, hydrocephalus, brain abscess, cyst formation, pulmonary and urinary tract infections. In infants, meningitis caused by *Cronobacter* is established 4 or 5 days after birth and can be fatal within hours to several days following the onset of first clinical signs. The mortality rate for neonatal infections has been reported to be as high as 80%, and survivors often suffer from severe irreversible neurological disorders [19, 32].

In adults

There have been few reports of *C. sakazakii* infection in adults, and it is not usually life-threatening.

Mortality and morbidity

The implications for infected neonates are severe. Once neonates are infected, they have a mortality rate of 40% to

www.SID.ir

80%, and a 20% chance of survival is accompanied by serious neurological complications [33, 34].

Epidemiology and reservoirs of *Cronobacter sakazakii*

Given the ubiquity of *Cronobacter sakazakii* animate environment (animals, man) and inanimate environment (plants, soil, water), it is not surprising that *C. sakazakii* is detected in many foods and food products of animal and vegetable origin [35].

Cronobacter sakazakii has been isolated from the products, such as chocolate, cereal, pasta, potato flour, milk powder, and spices. Also, this bacterium has been recovered from the guts of the stable fly (*Stomoxys calcitrans*), the Mexican fruit fly (*Anastrpha ludens*), and household vacuum cleaner bags [26, 36]. Oral and intestinal colonization with *C. sakazakii* may be associated with the ingestion of contaminated foods. As *C. sakazakii* is an opportunistic pathogen, the patient's colonization flora is the most probable source of infection under circumstances of immunosuppression and severe underlying diseases in patients after the neonatal period [35, 37]. *C. sakazakii* has been isolated from plant food and food ingredients like cereal, fruit and vegetables, legume products, herbs and spices as well as animal food sources like milk, meat, and fish and products made from these foods. The spectrum of *C. sakazakii*-contaminated food covers both raw and processed foods [35]. Food and food ingredients may be contaminated with *C. sakazakii* under hygiene mismanagement by contaminated insects and rats. *C. sakazakii* has been detected in food production as well as in domestic environments. The ubiquitous microorganism *C. sakazakii* has been isolated from a wide spectrum of environmental sources, including water, waste and thermal spring water, soil, dust from households, and food production-lines [3, 35, 38, 39].

C. sakazakii-contaminated vegetarian food and drinks comprise vegetables, fruit, legumes, cereal, herbs, spices, and other related products. *C. sakazakii* has been isolated from the xylem fluid of lemon rootstocks, the rhizosphere of wheat, and as endophytic bacteria from the leaves of rice plants [35]. It has also been detected in the bacterial colonization flora of disinfected sugar beet seeds. As *C. sakazakii* belongs to the cultivable endophytic and epiphytic flora of rice and soybean plants, it could be isolated from the related food products [35, 40, 41]. Some traditional cereal-, herb- and legume-based food and beverages were contaminated with *C. sakazakii*. The bacterium may be part of starter cultures for the fermentation of traditional vegetarian food products. *C. sakazakii* has been detected in mixed salad vegetables and imported, fresh, and deep-frozen vegetables at the retail level [35, 42].

C. sakazakii-contaminated food of animal origin comprise a variety of meat and meat products from camel, pig, beef, and poultry, besides eggs, raw milk and different dairy products and, less frequently, fish [35]. *C. sakazakii* has been isolated from animals, especially from birds, lizards, rats, and piglets. In vertebrates, *C. sakazakii* is a member of the normal (animal and human) oral and intestinal flora. It was found among the isolates from secretions of an infected mammary gland of dairy heifers. Liu et al. detected *C. sakazakii* in feed for pets. Also, *C. sakazakii* was isolated from various raw and ready-to-eat meat (products) [35, 43]. Isolated *C. sakazakii* has been found during a complicated curing process of meat products. It is a histamine-forming microorganism in the ripening process of cheese and has been isolated from a cheese whey substrate. Researchers demonstrated the lipolytic activity of a *C. sakazakii*-strain. *C. sakazakii* has been detected in fresh and prepared fish, too. A tetracycline-resistant *C. sakazakii*-strain from a Chilean freshwater salmon farm with no history of recent antibiotic use has been isolated. It has also been isolated from smoked sardines after 12 weeks of storage after irradiation [35, 44].

C. sakazakii with the total frequencies of 1.8% (10/564 strains) and 0.4% (1/256 strains) was detected when investigating the central and local drinking water supplies, respectively. During their investigation for biofilm formation, the bacteria indigenous to the water distribution system was found. Even bottled beverages should not be considered free of microorganisms [35, 45].

Transmission

Cronobacter sakazakii is thermo-tolerant and can contaminate PIF both intrinsically and extrinsically. Intrinsic contamination results from introducing the organism into the PIF at some stages during the manufacturing process. In contrast, extrinsic contamination may result from the use of contaminated utensils, such as blenders and spoons, to prepare PIF [46].

C. sakazakii are known to contaminate infant formula through the raw materials used for producing the formula or other dry ingredients after pasteurization; the caregiver may reconstitute the contamination of the formula just before feeding [47]. In most cases, the transmission route of *Cronobacter*-associated infant infections has not been confirmed. However, epidemiological studies in several incidents have implicated rehydrated PIF products as the vehicle of transmission and utensils used for formulae preparation as the likely source of contamination [19, 48].

www.SID.ir

Infection incidence

Although the number of well-documented cases of *Cronobacter sakazakii* infections in infants worldwide has increased in recent years, it has remained very low compared to many other infectious diseases. Also, there are reports in the literature about *C. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) infections in older age groups, including adults, but the rate of infection among infants is lower. There has been no reported systematic review of cases in children and adults [49].

Pathogenicity and virulent factors

Virulence determinants of *Cronobacter sakazakii* are still unknown, and pathogenicity mechanisms have only begun to be researched. *C. sakazakii* is a foodborne pathogen that can cause severe illnesses and even death in persons with immunological deficiencies such as neonates, hospitalized patients in NICU, persons with severe underlying diseases, and the elderly. In these populations, this bacterium can successfully establish, colonize, and ultimately produce severe diseases [50, 51]. In humans, *C. sakazakii* has been found to affect specifically the nervous, gastrointestinal, and vascular systems. Establishment in the human vascular system causes bacteremia and or sepsis. It is often preceded by colonization beyond the blood-brain barrier leading to cerebrospinal fluid infection and meningitis, which may progress into intracerebral infarctions, brain abscess, and or cyst formation resulting in central nervous system deterioration. Necrotizing Enterocolitis (NEC) caused by *C. sakazakii* is currently the most common gastrointestinal emergency in neonates, characterized by necrosis of the gastrointestinal lumen [50-52].

Adhesions and attachment

Cronobacter sakazakii has adhesive capacities to several in vitro cell lines, including endothelial and transformed epithelial lines. This bacterium can attach to intestinal cells and survive in macrophages, but the specific involved receptors have remained to be determined. Recently, it was shown that the disruption of tight junctions significantly enhances the association of *C. sakazakii* with Caco-2 cells [53]. Some reports suggest a similarity between the tropism of *Cronobacter sakazakii* and Citrobacter koseri for invasion and infection of the central nervous system. It was noted that brain abscesses due to *Cronobacter* and Citrobacter koseri were morphologically similar and may be due to similar virulence mechanisms [53, 54].

Cronobacter sakazakii carries endotoxin on its surface; however, other virulence factors may also be crucial to pathogenicity. For a pathogen to cause an infection in a host, it should adhere to and colonize host surfaces. Specific adhesion to host cells is considered to be an essential virulence factor for most bacterial pathogens. This foodborne pathogen appears to adhere instantaneously to host surfaces and then proliferates in a logarithmic manner until an optimal concentration is attained. The adhesion of *C.sakazakii* to epithelial cells is mainly non-fimbriae-based, suggesting the role of other virulence factors in binding. The bacterium exhibits clustered adhesion, a pattern that also has been associated with neonatal colitis-causing strains of Klebsiella pneumoniae [28, 32]. *C. sakazakii* has an unusual surviving ability under dry conditions, but the thermal tolerance of *C. sakazakii*-strains may be different [32, 35].

Exposure to *Cronobacter* induced apoptosis and increased expression of interleukin-6 in infant rats could effectively explain the pathogenicity of *Cronobacter*-associated NEC in neonates [19].

The adhesive behavior of *C. sakazakii* strains is impressive, but until only recently, it has been thoroughly investigated. Adherence has been reported on inorganic and synthetic surfaces, such as plastics, silicon, PVC, polycarbonate, glass, stainless steel, and public water systems. Adhesion to living surfaces such as in a pathogenic capacity has been shown to differ between strains, but all share the trait of being independent of fimbriae structures and require a metabolically active host cell for adhesion [55].

Capsule

Some strains of *Cronobacter sakazakii* produce a viscous capsular material, potentially allowing the organism to form a biofilm on feeding equipment and contact surfaces, and how this material contributes to macrophage evasion remains to be determined [50, 56]. *C. sakazakii* capsule may also protect the organism, facilitating its survival in desiccated environments. The biofilm and capsule have been shown to reduce the efficacy of various common sanitizing methods, such as UV-light radiation, high osmotic pressures, heat, dry conditions, starvation, low pH, detergents, antibiotics, phagocytes, antibodies, and some bacteriophages. This biofilm may protect *C. sakazakii*, allowing it to survive osmotic, thermal, and tensile stressors [56]. *Enterobacter sakazakii* also produces a viscous capsular material, potentially allowing the organism to form a biofilm on feeding equipment and contact surfaces [38]. This biofilm may protect ES, allowing it to survive osmotic, thermal, and tensile stressors. Mange et al. demonstrated that ES has adhesive capacities to several in vitro cell lines, including endothelial and transformed epithelial lines [19].

www.SID.ir

Furthermore, entry is enhanced in the presence of the host cell cytoskeleton (actin filaments and microtubule structures) and disruption of the tight junction. This event may account for the opportunistic nature of this infection, particularly in infants and neonates [19].

The abilities of *C. sakazakii* to produce capsule and biofilm reduce the efficacy of UV-light, high osmotic pressure, heat, dry conditions, starvation, acids, inhibitory detergents like sanitizers and antibiotics, phagocytes, antibodies, and bacteriophages. *C. sakazakii*-strains can adhere to surfaces of materials and are used in the production, preparation, and administration of food like plastics, silicon, latex, polyvinyl chloride, less frequently on glass and stainless steel. *C. sakazakii* has been cultivated from biofilms of drinking water systems [35].

Outer membrane protein A (ompA)

Cronobacter sakazakii expresses the outer membrane protein A (ompA) that shows a high degree of homology with ompA genes of other Gram-negative bacteria [28]. The ompA protein is crucial in the invasion of brain endothelial cells by *C. sakazakii*. The organism also induces microtubule condensation at the sites of entry in endothelial cells. OmpA expression is required for moderate invasion of human intestinal epithelial cells. The binding of this bacterium to enterocytes, both in vitro and in the animal model, induces enterocyte apoptosis/necrosis in a dose-dependent manner [57].

Also, *Cronobacter* invades human brain microvascular endothelial cells more often than epithelial cells, but entry requires the expression of outer membrane protein A (ompA) to induce microtubule condensation [19].

Biofilm formation

Cronobacter sakazakii can attach to plastics and silicon rubber surfaces and grow in a biofilm. Enteral feeding tubes and feeding-bottle teats can harbor the bacterium in large numbers. Biofilm formation may also be a factor associated with altered susceptibility to antimicrobials [3].

Lipopolysaccharide

Large amounts of Lipopolysaccharide (LPS) are released by the bacteria killed by antibiotics, phagocytosis, the complement complex, or treatment with divalent cation chelators. In an infected host, small amounts of LPS can be protective by stimulating the immune system, while large amounts induce high fever and lead to septic shock and death by multiorgan failure and systemic inflammatory response. LPS liberated from bacteria is associated with LPS Binding Protein (LBP), an acute-phase protein present in the bloodstream, and forms complexes consisting of LPS, LBP, and soluble CD14 (sCD14) [58, 59]. The O-antigen region is one of the most variable regions in the membranes of Gram-negative bacteria, and this variability is routinely used to discriminate serotypes within the species of bacteria. Within O-antigen gene clusters, the wzx and wzy genes have the most diverse nucleotide sequences, which has led to their wide use in serotype-specific PCR assays [59, 60]. Finally, high levels of heat-stable lipopolysaccharide (endotoxin) in infant formula may enhance the translocation of *Cronobacter* across the gut and blood-brain barrier, increasing the risk of bacteremia in neonates [19, 58].

Viable but Nonculturable state (the VNC state)

Cronobacter sakazakii can become injured when they are subjected to stress such as heat and drying. This bacterium can respond to stress by entering a unique physiological state known as the "viable but nonculturable" (often abbreviated as the VNC state). Bacterial pathogens in the Enterobacteriaceae family (for example, Escherichia coli O157:H7, Salmonella, Shigella, *Enterobacter cloacae*, Klebsiella) can enter this state [17].

Minimum lethal dose

The actual amount of ES contamination usually is low, ranging from 0.36 to 66 Colony-Forming Units (CFU)/100 g [28].

Immune system state

In industrial countries, persons may have a predisposing condition (e.g. those receiving chemotherapy, transplant persons, people with chronic diseases, HIV positive patients, those receiving immunosuppressive treatments) that suppresses their T-cell mediated immunity, thereby potentially raising their susceptibility to a broad range of bacterial infections, including *Cronobacter sakazakii* infections. Also, an unknown proportion of neonates, infants, and toddlers may be temporarily immunocompromised at any time because of the pharmaceutical treatments, such as steroids for asthma exacerbations, injury, effects of acute disease, or stress. In addition, there has been a significant increase in the prescription of gastric acid-suppressing medications for gastroesophageal reflux in infants and toddlers in industrialized settings [61, 62]. While not traditionally considered immuno-suppressing, such medications impair one of the first lines of defense humans have against ingested pathogens. Infants, in addition, have lower levels of gastric acid, making them more vulnerable to infections. The prevalence

www.SID.ir

of immunocompromising conditions may be relatively low in the developed countries, but the picture seems very different in developing countries, where the prevalence of such factors can rise to 40% [62].

Cronobacter sakazakii in powdered infant formula milk

Some of the vehicles of transmission and the infectious dose of *Cronobacter sakazakii* are unknown. The number of reported cases of *Cronobacter* infections is very low; nevertheless, it has slightly increased recently. *Cronobacter sakazakii* does not withstand the temperature at which milk is pasteurized, but it is easily found post-pasteurization, manufacturer environment, and preparation and handling before consumption. The thermal tolerance of *Cronobacter* in dried PIF has been well documented. This is why important steps towards preventive measures are needed to eliminate or avoid risks of PIF contamination and proliferation of the *C. sakazakii*. It is worth pointing out that breastfeeding should always be supported and encouraged since breast milk constitutes the preferred food for newborn infants, especially in their early months. When this is not possible, a mother should be well informed and educated on the importance of hygiene while handling, preparing, and storing PIF. Recommendations also underline the importance of using ready-to-feed PIF, complying with the rules for aseptic preparation and refrigeration at 2°C to 3°C of reconstituted PIF for a span of time shorter than 4 hours [2].

Treatment of infection caused by *Cronobacter sakazakii*

Traditionally, the treatment of *Cronobacter* infections with a combination of β-lactam (ampicillin) and aminoglycoside (gentamycin) or ampicillin-chloramphenicol has been successful [19]. It is sensitive to some antibiotics such as numerous β-lactams, antifolates, tetracycline, aminoglycosides, chloramphenicol, and quinolones. Also, trimethoprim-sulfamethoxazole may be useful. Nevertheless, many *Cronobacter* species are resistant to narrow-spectrum penicillins (i.e., ampicillin and amoxicillin) that traditionally have had good activity against members of the Enterobacteriaceae family. Emerging resistance of this bacterium to some antibiotics of choice should prompt physicians to consider carbapenems (ertapenem, meropenem, imipenem) or the newer broad-spectrum cephalosporins (e.g. cefepime) in combination with a second agent such as an aminoglycoside (e.g. gentamycin). Consequently, selecting antibiotics based on bacterial pure culture and susceptibility results and minimizing the use of broad-spectrum drugs are of paramount importance. *C. sakazakii* has intrinsic resistance to fusidic acids, streptogramins, glycopeptides, and lincosamides [28, 63].

Antimicrobial Resistance of *Cronobacter sakazakii*

C. sakazakii is intrinsically resistant to fosfomycin, rifampicin (rifampin), lincomycin, clindamycin, macrolides (clarithromycin, erythromycin, azithromycin), fusidic acid, and streptogramins. Nevertheless, resistance to ampicillin has increased owing to the production of β-lactamases and the acquisition of Transposable Elements (TEs) or jumping genes [2, 3, 64, 65]. *Cronobacter sakazakii* can inactivate cephalosporins and broad-spectrum antibiotics by secretion of β-lactamase enzymes [3, 64, 65].

Cronobacter sakazakii Resistance to routine sterilization methods

Cronobacter sakazakii is relatively resistant to dryness, heat, and osmotic stresses, which may explain, in part, its presence and survival in desiccated infant powder and similarly prepared products. Unsuitable storage and temperature regulation may raise the bacterial load, consequently facilitating infection outbreaks. Although *C. sakazakii* infection may increase secondary to reheating of formula and poor storage, it has not been documented definitely that staff of hospital themselves are not a vector for this foodborne pathogen. Unfortunately, hospital personnel may contribute to the spread of infection by ignoring suitable hygiene guidelines [66]. So, great care should be taken in contact with the isolation of infected and susceptible patients (infants) and adhering to strict hand washing. Also, *C. sakazakii* may form biofilms on different surfaces and, as a result of that acquiring resistance to disinfectants. It can survive in food powders for at least 12 months [28, 66, 67].

Tolerance or resistance of desiccated conditions for such a long time can be attributed to certain aspects of the *Cronobacter sakazakii* physiology, perhaps most notably because some isolates can produce a polysaccharide capsule. Over a 12-month storage period, the organism has been shown to survive better in dried formula products with an aw between 0.25 and 0.30 than at 0.69 and 0.82. *C. sakazakii* is resistant to desiccation over a wide range of aw (0.25-0.86) [68]. Sanitizer, disinfectants, and detergents reduce the *C. sakazakii* thermal resistance in powdered infant formula milk and other nutrient products.

Laboratory detection of *Cronobacter sakazakii*

An obstacle in diagnosing *C. sakazakii* infections and their sources is the ability or capacity of clinical, food, and environmental laboratories to identify the organism. The isolation of bacteria, such as *C. sakazakii*, from dried foods requires a series of steps to revitalize stressed cells that would otherwise not be cultured.

www.SID.ir

Table 1. Biochemical tests to differentiate Cronobacter from Enterobacter spp.

Tests	*Crono-bacter spp.*	*E. aero-genes*	*E. asbur-iae*	*E. can-cerogenus*	*E. cloacae*	*E. gergo-viae*	*E. hor-maechei*	*E. pyrinus*	*E. helveti-cus*	*E. turi-censis*
CIT	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
H_2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	-	-	+	-	-	-	v	v	+	+
VP	+	+	-	+	+	+	+	v	-	-
LDC	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
ADH	+	-	v	+	+	-	v	-	-	-
ODC	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
4-NP-α-Glc	+	-	-	-	-	-	-	v	+	+
SAC	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOR	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
RAF	+	+	v	-	+	+	-	-	-	-
ADO	-	+	-	-	v	-	-	-	-	-

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Note: CIT, use of citrate as sole carbon source; H_2S, production of hydrogen sulfide; MR, methyl red test; VP, Voges-Proskauer; LDC, lysine decarboxylase; ADH, arginine dihydrolase; ODC, ornithine decarboxylase; 4-NP-α-Glc, metabolism of 4-NP-α-glucoside; SAC, acid from sucrose; ARA, acid from arabinose; CEL, acid from cellobiose; SOR, acid from sorbitol; RAF, acid from raffinose; ADO, acid from adonitol; +, 90%–100% positive; v, 20%–80% positive; -, less than 10% positive.

Cronobacter is a genus of the Enterobacteriaceae family. It is a Gram-negative, facultatively anaerobic, oxidase-negative, catalase-positive, and rod-shaped bacterium. They are generally motile, reduce nitrate, use citrate, hydrolyze esculin and arginine, and are positive for L-ornithine decarboxylation. Acid is produced from D-glucose, D-sucrose, D-raffinose, D-melibiose, D-cellobiose, D-mannitol, D-mannose, L-rhamnose, L-arabinose, D-trehalose, galacturonate and D-maltose. *Cronobacter* spp. are also generally positive for acetoin production (Voges–Proskauer test) and negative for the methyl red test, indicating 2,3-butanediol rather than mixed acid fermentation [68-71]. Some important biochemical tests to differentiate *Cronobacter* from *Enterobacter* spp. are presented in Table 1.

Isolation and identification from clinical samples

The detection of bacteria from typically sterile sites (e.g. blood, CSF) is less complex than their detection and isolation from a powdered formula, as the organisms would not be stressed and are unlikely to be in a mixed population. Nevertheless, accurate clinical identification of isolates such as *C. sakazakii* is restricted by using methods that have not been specifically validated for the organism [70].

Isolation and identification from food

Isolation of *Cronobacter sakazakii* from food samples is performed according to FDA protocol. Three Erlenmeyer flasks of sterile distilled water (pre-warmed to 45°C) of 9, 90, and 900 mL containing 1, 10, and 100 g of PIF, respectively, are prepared. After the weighed samples are thoroughly mixed and dissolved in distilled water, it was incubated at 35±2°C for 18 to 24 hours. After incubation, 10 mL of each sample was added to 90 mL of Enterobacteriaceae Enrichment (EE) broth medium and placed at 35±2°C for 18 to 24 hours. Following the incubation, a loopful of the enrichment culture is streaked onto duplicate Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) medium plates, and incubation was performed for 18 to 24 hours at 35°C±2°C. Four

www.SID.ir

presumptive colonies are picked from each VRBGA plate, and pure culture was performed on MacConkey agar and Tryptic Soy Agar (TSA). The isolated colonies that produce yellow pigment on TSA medium at room temperature (25°C) are identified. For the final confirmation of isolates, manual biochemical tests and biochemical tests embedded in the API-20E biochemical kit system are used [2].

Different media, including *E. sakazakii* Selective Broth (ESSB), Druggan-Forsythe-Iversen agar, *Cronobacter* Screening Broth (CSB), *E. sakazakii* Enrichment Broth (ESE), EE broth, and modified Lauryl Sulfate Broth (mLST), are used for the isolation of *C. sakazakii* from food samples. Compared with conventional, labor-intensive methods, the recently developed fluoro- and chromo-genic differential selective media decrease the time for the isolation of *C. sakazakii* [72]. The phenotypic identification of *C. sakazakii* with commercial systems may be inadequate for the strains isolated from food specimens. Molecular genetic methods revealed that several strains identified as *C. sakazakii* by commercial biochemical kits belonged to distinct species. To confirm *C. sakazakii*, more than one differentiation system is recommended. Computationally-based methods, including biochemical and 16S rDNA-data, improve the reliability and the detection time of identification [35, 73].

Molecular detection of *Cronobacter sakazakii*

Different techniques have been designed to identify *Cronobacter sakazakii*. Key molecular tests and particular areas of the DNA sequence can be applied for the accurate discrimination of *C. sakazakii* from other closely related species. To date, assays for the isolation and identification of *C. sakazakii* have applied production of yellow pigment and the α-glucosidase test as presumptive differentiating characteristics. However, these assays can result in presumptive false positives because of groups of as yet unidentified non-*C. sakazakii* Enterobacteriaceae, which are also positive for both of these characteristics. The use of yellow pigment as a defining characteristic can also result in false-negative because of the occurrence of non-pigmented *C. sakazakii* isolates and the occasional transient nature of this trait [5].

Prevention strategies

There are no active surveillance systems and guidelines for *Cronobacter sakazakii* disease. The World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations made the following recommendations: (1) notify infant caregivers of the risks related to non-sterile powdered formula products, (2) encourage industry partners to develop a range of affordable sterile formula options, (3) if infants cannot breastfeed, consider feeding high-risk infants with sterile formula, and (4) consider setting an industry guideline for *C. sakazakii* and other Enterobacteriaceae members in infant formula milk. Factories warning labels on packages of powdered infant formula should stress that their products are non-sterile and need suitable handling, preparation, and storage and that sterile, liquid formula alternatives are available [26].

Pasteurization is effective in destroying *Cronobacter sakazakii*. Acidification reduced the concentration of *C. sakazakii* in vegetable-based foods and different types of infant formula products [35, 42]. Hygiene mismanagement due to incorrect time and temperature factors due to the transmission of bacteria via small vertebrates, insects, hands, and equipment should be avoided during the preparation process, production, and storage of food and drink. *C. sakazakii* may be related to food spoilage. It should be noted that the detection of the ubiquitous *C. sakazakii* in food is not always an indicator of hygiene mismanagement. For persons with acquired or congenital immunological deficiency, especially neonates, infants, elderly individuals, and persons with severe underlying diseases, the widespread occurrence of *C. sakazakii* and other Enterobacteriaceae members in the food and environment may indicate a health hazard [35].

2. Conclusion

Because of the ubiquitous nature of *Cronobacter sakazakii* and its unclear pathogenesis, preventive measures by parents, infant formula manufacturers, and health care providers will be necessary for the prevention of *C. sakazakii*-related infections. We recommend focusing on simple preventative strategies such as the promotion of breast milk feeding, the inclusion of warnings on powdered infant formula packages that they may be contaminated with *C. sakazakii*, and abstinence from the practice of re-warming of reconstituted formula. In adults, we believe that reconstituted dairy products should be avoided in immunosuppressed populations. Appropriate barrier precautions should be observed in ICU settings (both adult and neonatal), where the spread of infection may be more prevalent.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This article is a meta-analysis with no human or animal sample.

www.SID.ir

Funding

This study was supported financially by Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad City, Iran.

Authors' contributions

All authors listed have contributed sufficiently to the project to be included as authors, and all those who are qualified to be authors are listed in the author byline.

Conflicts of interest

All authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

Our thanks go to Hassan Khajehei, PhD, for copy editing of the manuscript.

www.SID.ir

Archive of SID

This Page Intentionally Left Blank

www.SID.ir

مقاله پژوهشی

کرونوباکتر ساکازاکی: یک باکتری پاتوژنیک منتقله از طریق مواد غذایی در بیماران مبتلا به نقص ایمنی و بستری

*جلال مردانه[1]

۱. گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی گناباد، گناباد، ایران.

تاریخ دریافت: ۰۴ آذر ۱۳۹۸
تاریخ پذیرش: ۲۲ اسفند ۱۳۹۹
تاریخ انتشار: ۱۲ فروردین ۱۴۰۰

چکیده

اهداف کرونوباکتر ساکازاکی (CS) عضوی از خانواده انتروباکتریاسه است و یک باسیل از نظر ژنتیکی ناهمگن، متحرک و گرم‌منفی است. این باکتری یک پاتوژن منتقله از طریق غذا و مرتبط با بلعیدن شیرخشک است که می‌تواند باعث سپسیس نوزادان، انتروکولیت نکروزان‌کننده و مننژیت شود. این بررسی روی جدیدترین اطلاعات در مورد ویژگی باکتریایی کرونوباکتر ساکازاکی و عفونت‌های انسانی ناشی از این باکتری بیماری‌زا متمرکز شده است.

مواد و روش‌ها ما در پایگاه داده‌های پزشکی مانند اسکوپوس، پاب‌مد، آی‌اس‌آی، وب آو ساینس و سایر وب‌سایت‌ها جست‌وجو کردیم.

یافته‌ها کرونوباکتر ساکازاکی به عنوان یک خطر میکروبی در زنجیره غذایی نوزادان، همراه با مرگ‌ومیر بالایی در نوزادان است. کمیسیون مشخصات میکروبیولوژیکی مواد غذایی، کرونوباکتر ساکازاکی را به عنوان باکتری خطرناک شدید برای افراد محدود، مدت‌زمان طولانی، عوارض مزمن قابل توجه یا تهدیدکننده زندگی طبقه‌بندی کرده است. اگرچه میزان بروز عفونت کرونوباکتر ساکازاکی کم است، اما پیش‌آگهی بیماری ضعیف است و عفونت، با مرگ‌ومیر قابل توجهی همراه است. محصولات شیرخشک (PIF) آلوده به کرونوباکتر ساکازاکی از نظر اپیدمیولوژیک با چندین مورد بالینی مرتبط شده‌اند. نوزادان نارس و کم‌وزن و بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه نوزادان (NICU) بیشتر از نوزادان بزرگ‌تر در معرض خطر عفونت قرار دارند.

نتیجه‌گیری ما تمرکز بر راهکارهای پیشگیرانه ساده مانند ارتقای تغذیه با شیر مادر، درج هشدار روی بسته‌های شیرخشک مبنی بر آلودگی آن‌ها به کرونوباکتر ساکازاکی و پرهیز از عمل گرم شدن مجدد شیرخشک را توصیه می‌کنیم.در بزرگسالان باید از مصرف محصولات لبنیاتی بازسازی‌شده در جمعیت سرکوب‌شده سیستم ایمنی خودداری شود. اقدامات احتیاطی پیشگیری‌کننده مناسب باید در تنظیمات NICU و ICU رعایت شود، جایی که شیوع عفونت ممکن است بیشتر باشد.

کلیدواژه‌ها:
پاتوژن منتقله از غذا، کرونوباکتر ساکازاکی، نوزادان، بیماران بستری، عفونت‌ها، راهکارهای پیشگیری

مقدمه

تاریخچه

کرونوباکتر ساکازاکی[1] یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه[2] است که در سال ۱۹۸۰ به عنوان گونه باکتریایی جدیدی شناخته شد. در ابتدا مشخص شد که این باکتری مسئول مننژیت و سپسیس در نوزادان به عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب است [۱، ۲]. کرونوباکتر ساکازاکی از جنس «کرونوباکتر» است و از نظر ژنتیکی ناهمگن، متحرک (توسط تاژک) و میله گرم‌منفی است [۱]. این باکتری که ابتدا «کلواک‌های رنگی زرد» نام‌گذاری شد، به عنوان انتروباکتر ساکازاکی طبقه‌بندی شد. در سال ۱۹۸۰، با توجه به تنوع در حساسیت به آنتی‌بیوتیک، تولید رنگدانه‌ها، هیبریدیزاسیون DNA-DNA، واکنش‌های بیوشیمیایی، در مقایسه با انتروباکتر کلواکه [۳]. گزارش شده است که با استفاده از روش هیبریدیزاسیون DNA-DNA، کرونوباکتر ساکازاکی ۵۰ درصد با انتروباکتر کلواکه و سیتروباکتر کوزری[3] مرتبط است. کرونوباکتر ساکازاکی آبسه‌های مغزی مشابه با سیتروباکتر کوزری ایجاد می‌کند [۴].

1. Cronobacter sakazakii (CS)
2. Enterobacteriaceae
3. Citrobacter koseri

*نویسنده مسئول:
جلال مردانه
نشانی: گناباد، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، گروه میکروبیولوژی.
تلفن: ۱۸۹۲۱۵۸ (۹۱۷) ۹۸+
پست الکترونیکی: jalalmardaneh@yahoo.com

www.SID.ir

در سال ۱۹۸۰، فارمر و همکاران بر اساس الگوهای بیوشیمیایی گونه‌ها را تعیین کردند و پانزده گروه زیستی را نشان دادند. مشخصه تعریف‌کننده، فعالیت آنزیم α-گلوکوزیداز است [۵]. درنتیجه، محیط های افتراقی- انتخابی حاوی α-گلوکوزیدهای کروموژنیک یا فلوئوروژنیک مانند سوبسترای ۵-برومو-۴-کلرو-۳-ایندولیل، دی-آلفا-گلوکوپیرانوزید ارائه شده‌اند [۵، ۶]. اخیراً توالی rDNA 16S نشان داده است کیت‌های تشخیصی بیوشیمیایی بیش از یک گونه را به عنوان کرونوباکتر ساکازاکی حداقل با چهار زیرگروه بیوشیمیایی و ژنتیکی جداگانه شناسایی کرده‌اند [۵، ۷، ۸].

نام‌گذاری

کرونوباکتر ساکازاکی یک خطر میکروبی در زنجیره غذایی نوزادان است که به لحاظ تاریخی همراه با مرگ‌ومیر بالایی در نوزادان است. این بیماری از اوایل سال ۱۹۲۹، زمانی که با تولید یک کلونی زرد و ایجاد سپتیسمی در نوزادان همراه بود مطرح شد. نام «کرونوباکتر» به درستی از اساطیر یونان گرفته شده است.

Coronobacter sakazakii comb. nov به افتخار میکروبیولوژیست ژاپنی ریچی ساکازاکی، هنگامی که این گونه برای اولین‌بار در سال ۱۹۸۰ به عنوان انتروباکتر ساکازاکی تعریف شد، نام‌گذاری شد. از این‌رو، Cronobacter gen. nov پس از خدای اسطوره‌ای یونان، کرونوس، که به خاطر بلعیدن فرزندان خود هنگام تولد به این نام نامیده شده است نامگذاری شده است [۹]. کرونوس پسر اورانوس (بهشت) و گایا (زمین) بود که از ۱۲ تایتان کوچک‌تر بود. وی سرانجام پادشاه تایتان‌ها شد و خواهرش رئا را به عنوان همسر خود برگزید. رئا برای او تعدادی فرزند به دنیا آورد، از جمله استیا، دمیتر، هرا، هادس و پوزیدون. اما کرونوس قبلاً توسط والدینش اخطار داده شده بود که توسط فرزند خودش سرنگون خواهد شد. سپس همه آن بچه‌ها را قورت داد. وقتی زئوس متولد شد، رئا او را در جزیره کرت پنهان کرد و کرونوس را فریب داد تا در عوض سنگ را ببلعد. زئوس بزرگ شد، کرونوس را مجبور کرد که خواهران و برادران خود را کنار بگذارد، با کرونوس جنگ کرد و پیروز شد [۱۰].

کرونوباکتر ساکازاکی قبلاً تا سال ۱۹۸۰ به عنوان «Entero-bacter cloacae رنگدانه‌دار زرد» شناخته می‌شد. این باکتری اولین‌بار در سال ۱۹۸۰ به عنوان گونه‌ای جدید طبقه‌بندی شده و بر اساس تفاوت در واکنش‌های بیوشیمیایی، پیوند DNA-DNA و الگوهای حساسیت به آنتی‌بیوتیک معرفی شد [۱۱-۱۴].

تجزیه و تحلیل توالی هر دو بخش S16 rDNA و hsp60 نشان داد جداشده‌های کرونوباکتر ساکازاکی حداقل چهار خوشه مجزا تشکیل داده‌اند و پیشنهاد شده است که خوشه‌های ۲، ۳ و ۴ می‌توانند گونه‌های منحصر به فردی باشند. بر اساس فنوتیپ و هیبریداسیون DNA-DNA، بعدها انتروباکتر ساکازاکی برای طبقه‌بندی مجدد در یک جنس جدید کرونوباکتر پیشنهاد شد که متشکل از پنج گونه مجزا شامل Cronobacter sakazakii، C. muytjensii، C. turicensis، C. malonaticus و C. dub-linensis بود. با توجه به ارتباط نزدیک آن‌ها، تشخیص C. saka-zakii و C. malonaticus با تجزیه و تحلیل توالی 16rDNA S دشوار است [۱۵، ۱۶].

در سال ۲۰۰۷، میکروارگانیسم‌های مختلفی در جنس کرونوباکتر طبقه‌بندی شدند که شامل چهار گونه نام‌دار، یک گونه بدون نام و پنج زیرگونه بودند:

C.sakazakii زیرگونه‌های

sakazakii، C.sakazakii زیرگونه‌های

malonaticus، C.dublinensis subspecies dublinen-sis C.dublinensis زیرگونه‌های

lactaridi، C.dublinensis، C.dublinensis زیرگونه‌های

Lausanensis، C.muytjensii، C.turicensis، C.genomospecies 1 (گونه‌های متمایز، اما بی‌نام) [۱۷، ۱۸].

ژنوم و طبقه‌بندی

کرونوباکتر عضوی از خانواده انتروباکتریاسه و یک میله گرم‌منفی است که با تاژک زدن درهم و برهم حرکت می‌کند. این باکتری در سال ۱۹۸۰ با عنوان «انتروباکتر ساکازاکی» شناخته می‌شد که با توجه به مشخصات حساسیت به آنتی‌بیوتیک، تولید رنگدانه‌ها، واکنش‌های بیوشیمیایی و هیبریداسیون DNA-DNA از «انترو باکتر کلواک» متمایز می‌شود [۱۹]. متعاقباً، انتروباکتر ساکازاکی گونه‌ای بود که از نظر طبقه‌بندی پیچیده‌تر و از نظر ژنتیکی متنوع‌تر از آن بود که در ابتدا تصور می‌شد و درنتیجه، بررسی گسترده پلی‌فازیک منجر به پیشنهاد نسل جدید کرونوباکتر شد که وضعیت گونه‌ها را به تعدادی از گروه‌های زیستی انتروباکتر ساکازاکی اختصاص داد [۲۰]. جنس کرونوباکتر از شش گونه تشکیل شده است که شامل موارد زیر می باشند:

Cronobacter sakazakii, Cronobacter malonaticus, Cronobacter turicensis, Cronobacter muytjensii, Cronobacter dublinensis and Cronobacter genomo-species 1

مورفولوژی

کرونوباکتر ساکازاکی (پاتوژن همه‌گیر و فرصت‌طلب) یک تیره از خانواده انتروباکتریاسه و یک باکتری گرم‌منفی و میله‌ای‌شکل است که اندازه آن تقریباً بین ۳ میکرومتر در ۱ میکرومتر است و مشخص شده است که بسیار تاژک دارد، بنابراین متحرک است و می‌تواند یک بیوفیلم محافظتی تولید کند [۲۰، ۲۱].

www.SID.ir

متابولیسم و رشد

مشخص شده است که سویه‌های موجود در جنس کرونوباکتر دارای مسیرهای متابولیکی هستند که به عنوان کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و بی‌هوازی اختیاری توصیف می‌شوند. ترکیبات مورد استفاده و برای تولید انرژی شامل اسیدهای آمینه و مولکول‌های مختلف لیپوفیلیک، قندها و نیترات‌ها در واکنش‌های احیاء نیترات هستند [۲۲].

اگرچه درجه حرارت مطلوب برای رشد کرونوباکتر ساکازاکی ۳۹ درجه سانتی‌گراد است، دامنه دما برای رشد آن ۶ تا ۴۵ درجه و دامنه مطلوب ۳۷ تا ۴۳ درجه سانتی‌گراد است. کرونوباکتر در میان خانواده انتروباکتریاسه در برابر گرما مقاوم است. برخی از سویه‌های کرونوباکتر قادر به رشد در دمای ۴۷ درجه سانتی‌گراد و به آرامی در دمای تبرید خانگی هستند. این باکتری قادر است زیر ۴ درجه سانتی‌گراد رشد کند که نشان می‌دهد این گونه حتی در یخچال قادر به تکثیر است [۲۳].

عفونت‌های ناشی از کرونوباکتر ساکازاکی

کرونوباکتر ساکازاکی یک پاتوژن منتقله از طریق غذاست که مربوط به مصرف شیر خشک IFM است و می‌تواند باعث سپسیس نوزادان، مننژیت و انتروکولیت نکروزان شود. کرونوباکتر ساکازاکی به عنوان یک باکتری خطرناک شدید برای افراد محدود، مدت‌زمان طولانی، عوارض مزمن قابل توجه یا تهدیدکننده زندگی طبقه‌بندی شده است [۲۴].

کرونوباکتر ساکازاکی به عنوان یک ارگانیسم فرصت‌طلب و عامل ایجادکننده بیماری‌های تهدیدکننده زندگی در گروه‌های نوزادی در نظر گرفته می‌شود. اگرچه میزان بروز عفونت کرونوباکتر ساکازاکی کم است، اما پیش‌آگهی بیماری ضعیف است و عفونت با مرگ‌ومیر قابل توجهی همراه است. محصولات شیرخشک (PIF) آلوده به کرونوباکتر ساکازاکی با چندین مورد بالینی مرتبط بوده است [۳].

عفونت‌های مهم ناشی از کرونوباکتر ساکازاکی در نوزادان، انتروکولیت نکروزان، سپتیسمی و مننژیت تهدیدکننده زندگی است. نوزادان کم‌وزن و نارس و کسانی که بالای ۲۸ روز سن دارند بیشتر از بزرگ‌ترها در معرض خطر ابتلا به عفونت قرار دارند. نشانه‌ها و نتایج بالینی شامل عفونت جریان خون، انتروکولیت نکروزان‌کننده، مننژیت، تأخیر در رشد، تشکیل کیست، تشنج، آبسه مغز، هیدروسفالی و بطن و مرگ در ۴۰ تا ۸۰ درصد از موارد [۲۷-۲۵] است. میزان مرگ‌ومیر ناشی از انتروکولیت نکروزان (NEC) ناشی از کرونوباکتر ساکازاکی در بیماران شدیدتر از ۴۰ تا ۱۰۰ درصد است. این عفونت شایع‌ترین اورژانس جراحی دستگاه گوارش در نوزادان مبتلاست [۳].

در جمعیت‌های نوزادی، شیوع عفونت‌های کرونوباکتر ساکازاکی مربوط به شیر خشک آلوده بوده است. اکثر بیمارانی که از مننژیت کرونوباکتر ساکازاکی جان سالم به در برده‌اند، از عوارض عصبی شدیدی رنج می‌برند، از جمله عقب‌ماندگی رشد، کوادریپلژی و هیدروسفالی [۲۸]. حمل مدفوع کرونوباکتر ساکازاکی در بیماران با سن ۱۸ هفته گزارش شده است که نشان‌دهنده توانایی چسبندگی به غشای مخاطی و کلنی‌سازی طولانی‌مدت روده انسان توسط این ارگانیسم است و نیاز به ایزوله کردن بیماران آلوده را پشتیبانی می‌کند. انتروکولیت نوزادان با تغذیه روده‌ای، نارس بودن روده و تجمع میکروبی همراه است. این عفونت تقریباً ۱۳ درصد از کسانی که وزن آن‌ها هنگام تولد ۱/۵ تا ۲ کیلوگرم است و ۵ درصد کل نوزادان نارس را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲۹، ۲۸].

در کودکان

عفونت‌های کرونوباکتر ساکازاکی همچنان در نوزادان شایع است که معمولاً با پیش‌آگهی ضعیفی همراه است. میزان مرگ‌ومیر ۳۳ تا ۸۰ درصد گزارش شده است [۳۰]. همچنین میزان عفونت‌های کرونوباکتر ساکازاکی قابل توجه است. اکثر کودکانی که از مننژیت مرتبط با انتروباکتر جان سالم به در می‌برند (۹۴ درصد)، دچار عوارض عصبی برگشت‌ناپذیر می‌شوند که منجر به کوادریپلژی، امپدانس رشد و اختلال بینایی و شنوایی می‌شود. این عوارض غالباً به سکته‌های مغزی ثانویه نسبت داده می‌شوند. اگرچه نوزادان نارس با وزن کم در معرض خطر بیشتری هستند، عفونت کرونوباکتر ساکازاکی در بزرگسالان طبیعی و کم‌نقص ایمنی گزارش شده است. برخی از شیوع عفونت‌های باکتریایی در بخش‌های مراقبت ویژه نوزادان (NICU) به فرمول پودر آلوده به کرونوباکتر نسبت داده شده است [۳۱، ۳۰].

عفونت‌های ناشی از کرونوباکتر اغلب با موارد پراکنده‌ای از بیماری‌های تهدیدکننده زندگی، به‌ویژه سپتیسمی، انتروکولیت نکروزان (NEC) و مننژیت در نوزادان مرتبط است. نوزادان کمتر از ۲۸ روز و نوزادان با وزن کم هنگام تولد (یعنی کمتر از ۲/۵ کیلوگرم)، در مقایسه با بزرگسالان بالغ‌تر، در معرض خطر بیشتری قرار دارند [۱۹]. علائم عفونت شامل عفونت‌های جریان خون، NEC با نکروز روده و پنوماتوز روده، مننژیت منجر به بطن، هیدروسفالی، آبسه مغز، تشکیل کیست، عفونت‌های ریوی و مجاری ادراری است. در نوزادان، مننژیت ناشی از کرونوباکتر بین روزهای چهارم و پنجم پس از تولد ایجاد می‌شود و می‌تواند در طی چند ساعت تا چند روز پس از شروع اولین علائم بالینی کشنده باشد. گزارش شده است که میزان مرگ‌ومیر در مورد عفونت‌های نوزادی تا ۸۰ درصد است و بازماندگان غالباً از اختلالات عصبی شدید برگشت‌ناپذیری رنج می‌برند [۳۲، ۱۹].

www.SID.ir

افق دانش
فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی گناباد
Arch

در بزرگسالان

گزارشات کمی در مورد عفونت کرونوباکتر ساکازاکی در بزرگسالان گزارش شده است و معمولاً تهدیدکننده زندگی نیست.

مرگ‌ومیر و عوارض

پیامدهای مربوط به نوزادان آلوده شدید است. پس از آلوده شدن، میزان مرگ‌ومیر نوزادان ۴۰ تا ۸۰ درصد بیان شده است و ۲۰ درصد احتمال زنده ماندن با عوارض جدی عصبی همراه است [۳۳، ۳۴].

اپیدمیولوژی و اندوختگاه کرونوباکتر ساکازاکی

با توجه به فراگیر بودن محیط زیست کرونوباکتر ساکازاکی (حیوانات، انسان) و محیط بی‌جان (گیاهان، خاک، آب)، تعجب‌آور نیست که کرونوباکتر ساکازاکی در طیف گسترده‌ای از مواد غذایی و محصولات غذایی حیوانی و گیاهی شناسایی شده است. به‌طورکلی، کرونوباکتر ساکازاکی در غذا خیلی مکرر نیست [۳۵].

کرونوباکتر ساکازاکی از تولیدکنندگانی که برای تولید شکلات، غلات، ماکارونی، آرد سیب‌زمینی، پودر شیر و ادویه استفاده می‌کردند جدا شده است. همچنین این باکتری از روده مگس پایدار (Stomoxys calcitrans)، مگس میوه مکزیکی (An-astrpha ludens) و کیسه‌های جاروبرقی خانگی بازیابی شده است [۲۶، ۳۶]. کلنی‌سازی دهانی و روده‌ای با کرونوباکتر ساکازاکی ممکن است با بلعیدن غذاهای آلوده همراه باشد. از آنجا که کرونوباکتر ساکازاکی یک پاتوژن فرصت‌طلب است، فلور کلنی‌سازی بیمار محتمل‌ترین منبع عفونت در شرایط سرکوب سیستم ایمنی و بیماری‌های شدید زمینه‌ای در بیماران پس از دوره نوزادی است [۳۵، ۳۷]. کرونوباکتر ساکازاکی از مواد غذایی گیاهی مانند غلات، میوه و سبزیجات، حبوبات، گیاهان و ادویه‌ها و همچنین از منابع غذایی حیوانات مانند شیر، گوشت و ماهی و محصولات تهیه‌شده از این مواد غذایی جدا شد. طیف غذای آلوده به کرونوباکتر ساکازاکی غذاهای خام و فرآوری‌شده را تحت پوشش قرار می‌دهد [۳۵]. مواد غذایی ممکن است تحت شرایط سوء مدیریت بهداشت توسط حشرات و موش‌های آلوده به کرونوباکتر ساکازاکی آلوده شوند.

کرونوباکتر ساکازاکی در تولید مواد غذایی و همچنین در محیط‌های داخلی شناسایی شده است. میکروارگانیسم فراگیر کرونوباکتر ساکازاکی از طیف گسترده‌ای از منابع محیطی از جمله آب، پسماند و آب چشمه‌های حرارتی، خاک، گرد و غبار از خانه‌ها و خطوط تولید مواد غذایی جدا شده است [۳، ۳۵، ۳۸، ۳۹].

غذاها و نوشیدنی‌های گیاهی آلوده به کرونوباکتر ساکازاکی شامل سبزیجات، میوه‌ها، حبوبات، غلات، گیاهان، ادویه‌ها و سایر محصولات مرتبط است. کرونوباکتر ساکازاکی از مایع آوند چوبی پایه‌های لیمو، از ریزوسفر گندم و از طریق برگ‌های گیاهان برنج به عنوان «اندوفیتیک‌باکتریا» جدا شد [۳۵]. کرونوباکتر ساکازاکی در فلور کلنی‌سازی باکتریایی دانه‌های چغندرقند ضدعفونی‌شده تشخیص داده شد. از آنجایی که کرونوباکتر ساکازاکی به گیاهان endophytic و epiphyticflora قابل کشت گیاهان برنج و لوبیای سویا تعلق دارد، می‌توان آن را از محصولات غذایی مرتبط جدا کرد [۳۵، ۴۰، ۴۱]. برخی از غذاها و نوشیدنی‌های مبتنی بر غلات، گیاهان و حبوبات به کرونوباکتر ساکازاکی آلوده هستند. این باکتری ممکن است بخشی از کشت‌های اولیه برای تخمیر محصولات غذایی گیاهخواران سنتی باشد. کرونوباکتر ساکازاکی در سبزیجات سالاد مخلوط و سبزیجات وارداتی، تازه و منجمد در سطح خرده‌فروشی شناسایی شد [۳۵، ۴۲].

غذای آلوده به کرونوباکتر ساکازاکی، با منشأ حیوانی شامل انواع گوشت و فرآورده‌های گوشتی از شتر، خوک، گوشت گاو و مرغ، و علاوه بر این، تخم مرغ، شیر خام و محصولات لبنی مختلف و به ندرت ماهیان است [۳۵]. کرونوباکتر ساکازاکی از حیوانات به‌ویژه از پرندگان، مارمولک‌ها، موش‌ها و خوکچه‌ها جدا شده است. در مهره‌داران، کرونوباکتر ساکازاکی عضوی از فلور دهان و روده طبیعی (حیوانی و انسانی) است. این ماده در بین ترشحات غده پستانی آلوده تلیسه‌های لبنی نیز یافت شد. لیو و همکاران کرونوباکتر ساکازاکی را در خوراک حیوانات خانگی شناسایی کردند. همچنین کرونوباکتر ساکازاکی از انواع گوشت خام و آماده برای خوردن (محصولات) جدا شد [۳۵، ۴۳]. کرونوباکتر ساکازاکی در طی فرآیند پخت پیچیده محصولات گوشتی جدا شده است. کرونوباکتر ساکازاکی از میکروارگانیسم‌های تولیدکننده هیستامین در فرآیند فرآوری پنیر است. کرونوباکتر ساکازاکی از یک بستر پنیر جدا شده است. فعالیت لیپولیتیک سویه کرونوباکتر ساکازاکی توسط محققان نشان داده شد. کرونوباکتر ساکازاکی در ماهی تازه و آماده شناسایی شده است. یک سویه کرونوباکتر ساکازاکی مقاوم در برابر تتراسایکلین از یک مزرعه ماهی قزل‌آلای آب شیرین شیلی و بدون سابقه استفاده اخیر از آنتی‌بیوتیک جدا شد. همچنین بعد از ۱۲ هفته نگهداری پس از تابش از ساردین دودی جدا شده است [۳۵، ۴۴].

کرونوباکتر ساکازاکی با فرکانس کل ۸/۱ درصد (۵۶۴/۱۰ سویه) و ۴/۰ درصد (۲۵۶/۱ سویه) به ترتیب هنگام بررسی منابع آب آشامیدنی مرکزی و محلی تشخیص داده شد. در طی تحقیقات آن‌ها برای تشکیل بیوفیلم، باکتری‌های بومی سیستم توزیع آب پیدا شدند. حتی نوشیدنی‌های بطری نیز نباید عاری از میکروارگانیسم‌ها در نظر گرفته شوند [۳۵، ۴۵].

www.SID.ir

انتقال

کرونوباکتر ساکازاکی حرارتی است و می‌تواند PIF را به طور ذاتی و غیرطبیعی آلوده کند. آلودگی ذاتی ناشی از ورود ارگانیسم به PIF در برخی مراحل در طی فرآیند تولید است. در مقابل، آلودگی خارجی ممکن است در نتیجه استفاده از ظروف آلوده مانند مخلوط‌کن و قاشق در تهیه PIF باشد [۴۶].

کرونوباکتر ساکازاکی باعث آلوده شدن شیرخشک می‌شود: مواد اولیه‌ای که برای تولید شیرخشک یا سایر مواد خشک که پس از پاستوریزاسیون استفاده می‌شود، ممکن است با این باکتری آلوده شوند [۴۷]. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهند در تعدادی از حوادث، محصولات شیرخشک (PIF) به عنوان مسیر انتقال آلودگی به نوزادان مطرح است [۱۹، ۴۸].

شیوع عفونت

تعداد موارد ثبت‌شده عفونت کرونوباکتر ساکازاکی در نوزادان در سراسر جهان طی سال‌های اخیر افزایش یافته است، اما در مقایسه با بسیاری از بیماری‌های عفونی بسیار کم باقی مانده است. اگرچه در ادبیات گزارش‌هایی در مورد عفونت‌های کرونوباکتر ساکازاکی (Cronobacter spp) در گروه‌های سنی بالاتر از جمله بزرگسالان وجود دارد، میزان عفونت در نوزادان محدودتر است. هیچ گزارش منظمی از موارد عفونت در کودکان و بزرگسالان گزارش نشده است [۴۹].

عوامل بیماری‌زایی و حدت

عوامل حدت کرونوباکتر ساکازاکی هنوز ناشناخته است و مکانیسم‌های بیماری‌زایی فقط شروع به بررسی شده‌اند.

کرونوباکتر ساکازاکی یک پاتوژن منتقله از طریق غذاست که می‌تواند باعث بیماری‌های شدید و مرگ در افراد دارای نقص ایمنی مانند نوزادان، بیماران بستری در NICU، افراد با بیماری‌های شدید زمینه‌ای و افراد مسن شود. در این جمعیت‌ها، این باکتری می‌تواند با موفقیت کلنی‌سازی کرده و درنهایت بیماری‌های شدید تولید کند [۵۰، ۵۱]. مشخص شده است که در انسان،کرونوباکتر ساکازاکی به طور خاص بر سیستم‌های عصبی، گوارشی و عروقی تأثیر می‌گذارد. استقرار در سیستم عروقی انسان باعث باکتریمی یا سپسیس می‌شود که اغلب با کلنی‌سازی فراتر از سد مغزی خون منجر به عفونت مایع مغزی نخاعی و مننژیت می‌شود که ممکن است به سکته‌های مغزی داخل مغزی، آبسه مغز و / یا تشکیل کیست منجر شود و باعث زوال سیستم عصبی مرکزی گردد. انتروکولیت نکروزان (NEC) ناشی از کرونوباکتر ساکازاکی در حال حاضر شایع‌ترین اورژانس دستگاه گوارش در نوزادان است که با نکروز لومن دستگاه گوارش مشخص می‌شود [۵۰-۵۲].

اتصال و چسبندگی

کرونوباکتر ساکازاکی دارای ظرفیت چسبندگی به تعدادی از رده‌های سلولی in vitro، از جمله ردیف‌های «اندوتلیال» و «اپیتلیال تبدیل‌شده» است. این باکتری می‌تواند به سلول‌های روده متصل شود و در ماکروفاژها زنده بماند، اما گیرنده‌های خاص درگیر هنوز مشخص نیستند. اخیراً نشان داده شده است که به هم ریختگی اتصالات تنگ موجب افزایش چشم‌گیر ارتباط کرونوباکتر ساکازاکی با سلول‌های $Caco^2$ می‌شود [۵۳]. برخی گزارش‌ها شباهت بین تروپیسم کرونوباکتر ساکازاکی و سیتروباکتر کوزری برای حمله و عفونت سیستم عصبی مرکزی را نشان می‌دهند. همچنین ذکر شد که آبسه‌های مغزی ناشی از کرونوباکتر و سیتروباکتر کوزری از نظر مورفولوژی شبیه بوده و ممکن است به دلیل مکانیسم‌های حدت مشابه باشد [۵۳، ۵۴].

کرونوباکتر ساکازاکی، اندوتوکسین را در سطح خود حمل می‌کند. با این حال، سایر عوامل حدت نیز ممکن است برای بیماری‌زایی بسیار مهم باشند. برای اینکه پاتوژن در میزبان ایجاد عفونت کند، باید بتواند به سطح سلول میزبان بچسبد و کلنی‌سازی کند. چسبندگی خاص به سلول‌های میزبان یک عامل حدت ضروری برای اکثر عوامل بیماری‌زای باکتریایی محسوب می‌شود. به نظر می‌رسد این عامل بیماری‌زای مواد غذایی بلافاصله به سطوح میزبان می‌چسبد و سپس تا رسیدن به غلظت بهینه به روش لگاریتمی تکثیر می‌یابد. چسبندگی کرونوباکتر ساکازاکی به سلول‌های اپیتلیال عمدتاً مبتنی بر فیبریا نیست و این نشانگر نقش سایر عوامل حدت در اتصال است. این باکتری چسبندگی خوشه‌ای را نشان می‌دهد، الگویی که با سویه‌های کلبسیلا پنومونیه ایجادکننده کولیت نوزادان نیز مرتبط است [۲۸، ۳۲]. کرونوباکتر ساکازاکی در شرایط خشک توانایی زنده ماندن غیرمعمولی دارد، اما تحمل حرارتی سویه‌های کرونوباکتر ساکازاکی ممکن است متفاوت باشد [۳۲، ۳۵].

قرار گرفتن در معرض آپوپتوز ناشی از کرونوباکتر و افزایش بیان اینترلوکین-۶ در موش‌های شیرخوار، می‌تواند به طور مؤثر بیماری‌زایی NEC مرتبط با کرونوباکتر را در نوزادان توضیح دهد [۱۹].

رفتار چسبندگی سویه‌های کرونوباکتر ساکازاکی نیز به همان اندازه چشم‌گیر است، و این مهم همین اواخر کاملاً مورد بررسی قرار گرفته است. چسبندگی در سطوح غیرآلی و مصنوعی مانند پلاستیک، سیلیکون، پی‌وی‌سی، پلی‌کربنات، شیشه، فولاد ضدزنگ و در سیستم‌های آب عمومی گزارش شده است. نشان داده شده است که چسبندگی به سطوح زنده مانند ظرفیت بیماری‌زایی بین سویه‌ها متفاوت است، اما همه دارای ویژگی مستقل بودن از ساختارهای «فیمبریا» هستند و برای چسبندگی به سلول میزبان متابولیکی فعال نیاز دارند [۵۵].

www.SID.ir

کپسول

برخی از سویه‌های کرونوباکتر ساکازاکی ماده کپسولی چسبناکی تولید می‌کنند که به طور بالقوه به ارگانیسم اجازه می‌دهد تا در تجهیزات تغذیه و سطوح تماس، بیوفیلم ایجاد کند و نحوه کمک این ماده به فرار از ماکروفاژ مشخص است [۵۶، ۵۰]. کپسول کرونوباکتر ساکازاکی همچنین ممکن است دارای نقش محافظتی برای ارگانیسم باشد که بقای آن را در محیط‌های خشک‌شده تسهیل می‌کند. نشان داده شده است که بیوفیلم و کپسول باعث کاهش کارایی روش‌های متداول ضدعفونی‌کننده نظیر اشعه ماورای بنفش، فشارهای اسمزی بالا، گرما، شرایط خشک، گرسنگی، pH کم، مواد شوینده، آنتی‌بیوتیک، فاگوسیت‌ها، آنتی‌بادی‌ها و برخی از باکتریوفاژها می‌شود. این بیوفیلم ممکن است از کرونوباکتر ساکازاکی محافظت کند و به آن اجازه دهد تا از عوامل استرس‌زا، گرمازا و اسمزی در امان بماند [۵۶].

علاوه بر این، ورود در حضور اسکلت سلولی میزبان (رشته‌های اکتین و ساختارهای میکروتوبول) و ایجاد اختلال در اتصال محکم سلولی ورود باکتری افزایش می‌یابد. این ممکن است ماهیت فرصت‌طلبانه این عفونت، به‌ویژه در نوزادان را نشان دهد [۱۹].

توانایی‌های کرونوباکتر ساکازاکی در تولید کپسول و بیوفیلم باعث کاهش اثر نور ماورا بنفش، فشار اسمزی بالا، گرما، شرایط خشکی، گرسنگی، اسیدها، شوینده‌های بازدارنده مانند ضدعفونی‌کننده‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها، فاگوسیت‌ها، آنتی‌بادی‌ها و باکتریوفاژها می‌شود. سویه‌های کرونوباکتر ساکازاکی قادر به چسبیدن به سطوحی از مواد مورد استفاده در تولید، تهیه و تجویز مواد غذایی مانند پلاستیک، سیلیکون، لاتکس، پلی‌وینیل کلراید، شیشه و فولاد ضدزنگ هستند. کرونوباکتر ساکازاکی از بیوفیلم‌های سیستم‌های آب آشامیدنی کشت شد [۳۵].

پروتئین غشای خارجی انتروباکتر ساکازاکی A

کرونوباکتر ساکازاکی پروتئین غشای خارجی A (ompA) را بیان می‌کند که درجه بالایی از همسانی را با ژن‌های ompA سایر باکتری‌های گرم‌منفی نشان می‌دهد [۲۸]. پروتئین ompA در حمله سلول‌های اندوتلیال مغز توسط کرونوباکتر ساکازاکی بسیار مهم است. این ارگانیسم همچنین باعث تراکم میکروتوبول در محل‌های ورود به سلول‌های اندوتلیال می‌شود. برای حمله متوسط به سلول‌های اپیتلیال روده انسان، بیان OmpA لازم است. اتصال این باکتری به سلول‌های انتروسی، چه در شرایط آزمایشگاهی و چه در مدل حیوانی، به روش وابسته به دوز باعث آپوپتوز / نکروز انتروسیت می‌شود [۵۷].

همچنین کرونوباکتر بیشتر از سلول‌های اپیتلیال به سلول‌های اندوتلیال ریز عروقی مغز انسان حمله می‌کند، اما ورود به آن نیاز به بیان پروتئین غشای خارجی A (ompA) برای القای میعانات میکروتوبول دارد [۱۹].

تشکیل بیوفیلم

کرونوباکتر ساکازاکی می‌تواند به پلاستیک‌ها و سطوح لاستیک سیلیکون متصل شود و در یک بیوفیلم رشد کند. لوله‌های تغذیه روده‌ای و پستانک‌های شیشه شیر می‌توانند تعداد زیادی از باکتری را در خود جای دهند. تشکیل بیوفیلم همچنین ممکن است عاملی باشد که با تغییر حساسیت به ضدمیکروب‌ها ارتباط دارد [۳].

لیپوپلی‌ساکارید (LPS)

مقادیر زیادی LPS توسط باکتری‌های ازبین‌رفته توسط آنتی‌بیوتیک‌ها، فاگوسیتوز، کمپلکس مکمل یا درمان باکلاتورهای کاتیونی دوظرفیتی آزاد می‌شود. مقادیر کم LPS می‌تواند با تحریک سیستم ایمنی محافظت ایجاد نماید، در حالی که مقادیر زیاد آن باعث تب شدید می‌شود و منجر به شوک سپتیک و مرگ در اثر نارسایی چند ارگانیک و پاسخ التهابی سیستمیک می‌گردد. LPS آزادشده از باکتری‌ها با پروتئین متصل‌شونده به لیپوپلی‌ساکارید (LBP) که یک پروتئین فاز حاد موجود در جریان خون است در ارتباط است و مجتمع‌هایی را تشکیل می‌دهد که از LPS و LBP و 14CD محلول (14sCD) تشکیل می‌شود [۵۹، ۵۸]. منطقه آنتی‌ژن O یکی از متغیرترین مناطق در غشای باکتری‌های گرم‌منفی است و این تنوع به طور معمول برای تمایز سروتیپ‌ها در داخل گونه‌های باکتری استفاده می‌شود. در داخل خوشه‌های ژنی آنتی‌ژن O، ژن‌های wzx و wzy متنوع‌ترین توالی نوکلئوتیدی را دارند که منجر به استفاده گسترده از آن‌ها در سنجش‌های PCR مخصوص سروتیپ شده است [۶۰، ۵۹]. سرانجام، سطوح بالای لیپوپلی‌ساکارید (اندوتوکسین) پایدار در برابر حرارت در ترکیب شیر نوزاد ممکن است باعث افزایش جابه‌جایی کرونوباکتر از طریق روده و سد خونی مغزی شوند و خطر ابتلا به باکتری در نوزادان را افزایش دهند [۱۹، ۵۸].

حالت زنده اما غیر قابل کشت (VNC)

کرونوباکتر ساکازاکی هنگامی که تحت شرایط تنش‌زا مانند گرما و خشک شدن قرار می‌گیرد، می‌تواند آسیب ببیند. این باکتری می‌تواند با ورود به یک حالت فیزیولوژیکی منحصر به فرد که به عنوان «زنده اما غیر قابل کشت» (که اغلب به اختصار حالت «VNC» شناخته می‌شود)، به استرس پاسخ دهد. عوامل بیماری‌زای باکتریایی در خانواده انتروباکتریاسه (به عنوان مثال اشریشیاکلی O157: H7، سالمونلا، شیگلا، انتروباکتر کلواکا، کلبسیلا) می‌توانند وارد این حالت شوند [۱۷].

www.SID.ir

حداقل دوز کشنده

میزان واقعی آلودگی ES معمولاً کم است و از ۳۶/۰ تا ۶۶ واحد تشکیل‌دهنده کلنی (CFU)/۱۰۰ گرم متغیر است [۲۸].

حالت سیستم ایمنی

در کشورهای صنعتی، افراد ممکن است یک بیماری مستعد داشته باشند (به عنوان مثال، افراد تحت شیمی‌درمانی، افراد پیوندی، افراد مبتلا به بیماری‌های مزمن، بیماران مبتلا به HIV مثبت، کسانی که تحت درمان‌های سرکوب‌کننده سیستم ایمنی هستند) که ایمنی ناشی از سلول T را سرکوب می‌کند، بنابراین بالقوه حساسیت آن‌ها به طیف گسترده‌ای از عفونت‌های باکتریایی، از جمله عفونت‌های کرونوباکتر ساکازاکی افزایش می‌یابد. همچنین به دلیل درمان‌های دارویی، مانند استروئیدها یا استرس، ممکن است نوزادان و کودکان تازه متولد شده دچار نقص ایمنی شوند. علاوه بر این، در تجویز داروهای سرکوب‌کننده اسید معده برای ریفلاکس معده و مری در نوزادان و کودکان نوپا در محیط‌های صنعتی افزایش قابل توجهی مشاهده شده است [۶۱، ۶۲]. این داروها اگرچه به طور سنتی سرکوب‌کننده سیستم ایمنی در نظر گرفته نمی‌شوند اما یکی از اولین خطوط دفاعی انسان را در برابر عوامل بیماری‌زای بلعیدن مختل می‌کنند. علاوه بر این، در نظر گرفته می‌شود که نوزادان دارای سطح اسید معده کمتری هستند و باعث می‌شود آن‌ها در برابر عفونت آسیب‌پذیرتر شوند. شیوع شرایط نقص ایمنی ممکن است در کشورهای پیشرفته نسبتاً کم باشد، اما در کشورهای در حال توسعه (که شیوع چنین عواملی می‌تواند تا ۴۰ درصد باشد)، بسیار متفاوت به نظر می‌رسد [۶۲].

کرونوباکتر ساکازاکی در شیرخشک (PIF)

برخی از وسایل حمل و نقل و دُز عفونی کرونوباکتر ساکازاکی ناشناخته است. تعداد موارد گزارش‌شده از عفونت کرونوباکتر بسیار کم است، با این وجود اخیراً کمی افزایش یافته است. از آنجایی که کرونوباکتر ساکازاکی در دمای پاستوریزه شدن شیر مقاومت نمی‌کند، پس از پاستوریزاسیون، محیط تولیدکننده و همچنین در حین تهیه و کار با آن قبل از مصرف به راحتی پیدا می‌شود. تحمل حرارتی کرونوباکتر در PIF خشک‌شده به خوبی اثبات شده است. به همین دلیل است که برای جلوگیری از خطرات آلودگی PIF و تکثیر کرونوباکتر ساکازاکی، گام‌های مهم در جهت اقدامات پیشگیرانه مورد نیاز است. شایان ذکر است که شیر مادر باید همیشه مورد حمایت و تشویق قرار گیرد، زیرا شیر مادر غذای مورد علاقه برای نوزادان تازه متولدشده به‌ویژه در ماه‌های اولیه آن‌هاست. وقتی این امکان وجود ندارد، مادر باید هنگام استفاده، تهیه و نگهداری PIF به خوبی در مورد اهمیت بهداشت، آگاهی و آموزش داشته باشد. PIFآماده شده بایستی در یخچال و فریزر در دمای ۲ تا ۳ درجه سانتی‌گراد برای مدت‌زمان کوتاه‌تر از ۴ ساعت نگهداری شود [۲].

درمان عفونت ناشی از کرونوباکتر ساکازاکی

به طور سنتی، درمان عفونت‌های کرونوباکتر با ترکیبی از بتا لاکتام (آمپی‌سیلین) و آمینوگلیکوزید (جنتامایسین) یا آمپی‌سیلین کلرامفنیکل موفق بوده است [۱۹]. این ماده به بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله تعداد زیادی بتا لاکتام، ضدافلات، تتراسایکلین‌ها، آمینوگلیکوزیدها، کلرامفنیکل و کینولون‌ها حساس است. همچنین تری‌متوپریم سولفامتوکسازول ممکن است مفید باشد. با این وجود، بسیاری از گونه‌های کرونوباکتر به پنی‌سیلین‌های با طیف باریک (یعنی آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین) مقاوم هستند که به طور سنتی فعالیت خوبی در برابر اعضای خانواده انتروباکتریاسه داشته‌اند. مقاومت فزاینده این باکتری در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی باید پزشکان را به فکر کارباپنم (ارتاپنم، مروپنم، ایمیپنم) یا سفالوسپورین‌های طیف گسترده جدید (به عنوان مثال سفپیم) در ترکیب با عامل دوم مانند آمینوگلیکوزید (به عنوان مثال جنتامایسین) بیندازد. درنتیجه، انتخاب آنتی‌بیوتیک‌ها براساس کشت خالص باکتریایی و نتایج حساسیت و به حداقل رساندن استفاده از داروهای طیف گسترده از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است. کرونوباکتر ساکازاکی، مقاومت ذاتی در برابر اسیدهای فوزیدیک، استرپتوگرامین‌ها، گلیکوپپتیدها و لینکوزامیدها دارد [۲۸، ۶۳].

مقاومت ضدمیکروبی کرونوباکتر ساکازاکی

کرونوباکتر ساکازاکی به طور ذاتی در برابر فسفومایسین، ریفامپیسین (ریفامپین)، لینکومایسین، کلیندامایسین، ماکرولیدها (کلاریترومایسین، اریترومایسین، آزیترومایسین)، اسید فوزیدیک و استرپتوگرامام مقاوم است. با این وجود، مقاومت در برابر آمپی‌سیلین به دلیل تولید بتا لاکتامازها و به دست آوردن عناصر قابل انتقال (TE) یا ژن‌های پرش‌کننده افزایش یافته است [۲، ۳، ۶۴، ۶۵]. کرونوباکتر ساکازاکی با تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز سفالوسپورین‌ها و پنی‌سیلین‌های طیف گسترده را غیرفعال می کند [۳، ۶۴، ۶۵].

مقاومت کرونوباکتر ساکازاکی در برابر روش‌های معمول عقیم‌سازی

کرونوباکتر ساکازاکی نسبتاً در برابر تنش‌های خشکی، گرما و اسمزی مقاوم است که ممکن است تا حدی وجود و زنده ماندن آن در پودر خشک‌شده نوزاد و محصولات مشابه را توضیح دهد. تنظیم نامناسب ذخیره‌سازی و دما ممکن است منجر به افزایش بار باکتری شود، درنتیجه شیوع عفونت را تسهیل می‌کند. اگرچه عفونت کرونوباکتر ساکازاکی ممکن است یک‌بار دیگر نسبت به گرم شدن مجدد شیرخشک و ذخیره نامناسب افزایش یابد،

www.SID.ir

اما به طور قطع اثبات نشده است که کارکنان بیمارستان خود ناقل این عامل بیماری‌زای مواد غذایی نیستند. متأسفانه، پرسنل بیمارستان ممکن است با نادیده گرفتن رهنمودهای بهداشتی مناسب در گسترش عفونت نقش داشته باشند [۶۶]. بنابراین، باید در جداسازی تماس بیماران آلوده و مستعد (نوزادان) و رعایت دقیق شست‌وشوی دست دقت زیادی صورت گیرد. همچنین کرونوباکتر ساکازاکی ممکن است در سطوح مختلف و درنتیجه مقاومت در برابر ضدعفونی‌کننده‌ها، بیوفیلم ایجاد کند و می‌تواند حداقل دوازده ماه در پودرهای غذایی زنده بماند [۶۷، ۶۶، ۲۸].

تحمل یا مقاومت در برابر شرایط خشکی برای چنین مدت طولانی می‌تواند به جنبه‌های خاصی از فیزیولوژی کرونوباکتر ساکازاکی نسبت داده شود، برخی سویه‌ها تولید کپسول پلی ساکاریدی می‌کنند. در طی یک دوره ذخیره‌سازی دوازده ماه، نشان داده شده است که ارگانیسم در محصولات شیرخشک با دمای بین ۲۵/۰ تا ۳۰/۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به ۶۹/۰ و ۸۲/۰ درجه سانتی‌گراد بهتر زنده می‌ماند. کرونوباکتر ساکازاکی در طیف وسیعی از aw (۲۵/۰-۸۶/۰) در برابر خشک شدن مقاوم است [۶۸]. ضدعفونی‌کننده‌ها و شوینده‌ها مقاومت حرارتی کرونوباکتر ساکازاکی را در شیرخشک نوزاد و سایر محصولات مغذی کاهش می‌دهند.

تشخیص آزمایشگاهی کرونوباکتر ساکازاکی

یک عامل محدودکننده در تشخیص عفونت‌های کرونوباکتر ساکازاکی و منابع آن‌ها توانایی یا ظرفیت آزمایشگاه‌های بالینی، غذایی و محیطی برای شناسایی ارگانیسم است. جداسازی باکتری‌ها، مانند کرونوباکتر ساکازاکی، از غذاهای خشک نیاز به یک سری مراحل برای احیای سلول‌های تحت فشار دارد که در غیر این صورت کشت نمی‌شوند.

کرونوباکتر نوعی باکتری گرم‌منفی، غیرهوازی از نظر اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و میله‌ای از خانواده انتروباکتریاسه است. آن‌ها به‌طورکلی متحرک هستند، نیترات را احیا می‌کنند، از سیترات، هیدرولیز اسکولین و آرژنین استفاده می‌کنند و از نظر دکربوکسیلاسیون ال-اورنیتین مثبت هستند. اسید از دی-گلوکز، دی-ساکارز، دی-رافینوز، دی-ملیبیوز، دی-سلوبیوز، دی-مانیتول، دی-مانوز، ال-رامنوز، ال-آرابینوز، دی-تره‌هالوز، گالاکتورونات و دی-مالتوز تولید می‌شود. Cronobacter spp همچنین به طور کلی برای تولید استوئین، مثبت (آزمون وژز پروسکوئر[4]) و برای آزمایش متیل‌قرمز منفی هستند که نشان‌دهنده تخمیر اسید مخلوط ۲،۳-بوتاندیول است [۷۱-۶۹]. برخی از آزمایش‌های مهم بیوشیمیایی با استفاده از تمایز کرونوباکتر از Enterobacter spp در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

4. Vogesproskaure

جداسازی و شناسایی از نمونه‌های بالینی

تشخیص باکتری‌ها از مکان‌های معمول استریل (به عنوان مثال خون، مایع مغزی نخاعی) نسبت به تشخیص و جداسازی آن‌ها از شیرخشک کمی پیچیده‌تر است، زیرا ارگانیسم‌ها تحت فشار قرار نمی‌گیرند و بعید است در یک جمعیت مخلوط باشند. با این وجود، شناسایی دقیق بالینی جدایه‌ها مانند کرونوباکتر ساکازاکی با استفاده از روش‌هایی که به طور خاص برای ارگانیسم تأیید نشده‌اند، محدود شده است [۷۰].

جداسازی و شناسایی از مواد غذایی

جداسازی کرونوباکتر ساکازاکی از نمونه‌های غذایی، طبق پروتکل سازمان غذا و دارو (FDA) انجام می‌شود. سه ارلن‌مایر با آب مقطر استریل (پیش گرم تا ۴۵ درجه سانتیگراد) در ۹، ۹۰ و ۹۰۰ میلی‌لیتر حاوی ۱، ۱۰ و ۱۰۰ گرم PIF تهیه شده است. بعد از اینکه نمونه‌های توزین‌شده کاملاً مخلوط و در آب مقطر حل شدند، در دمای ۲±۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوبه می‌شوند. پس از انکوباسیون، ۱۰ میلی‌لیتر از هر نمونه به ۹۰ میلی‌لیتر محیط آبگوشت غنی‌سازی انتروباکتریاسه اضافه می‌شود و در دمای ۲±۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت قرار می‌گیرد. پس از انکوباسیون، یک لوپ از کشت غنی‌سازی روی کپی‌های ورقه‌های گلوکز آگار صفراوی بنفش (VRBGA) کپی شده و انکوباسیون به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۲ ± ۳۵ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود. چهار کلنی فرضی از هر پلیت VRBGA انتخاب می‌شود و کشت خالص روی آگار مک‌کانگی و آگار سویا (TSA) انجام می‌شود. کلنی‌های جداشده که در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) در محیط TSA رنگدانه زرد تولید می‌کنند، شناسایی می‌شوند. برای تأیید نهایی جدایه‌ها، از آزمایش‌های دستی بیوشیمیایی و آزمایش‌های بیوشیمیایی جاسازی‌شده در سیستم کیت بیوشیمیایی API-20E استفاده می‌شود [۲].

محیط‌های مختلف از جمله آبگوشت انتخابی (E.sakazakii ESSB)، آگار (Druggan-Forsythe-Iversen)، آبگوشت غربالگری کرونوباکتر (CSB)، آبگوشت غنی‌سازی (E. Sakaza-kii ESE)، آبگوشت غنی‌سازی (Enterobacteriaceae EE) و آبگوشت سولفات لوریل اصلاح‌شده (mLST) برای جداسازی کرونوباکتر ساکازاکی از نمونه‌های غذایی استفاده می‌شوند. در مقایسه با روش‌های متداول و پرمشغله، محیط‌های انتخابی فلوئور و کروموژنیک، افتراقی، که اخیراً ایجاد شده‌اند، زمان جداسازی کرونوباکتر ساکازاکی را کاهش می‌دهند [۷۲]. شناسایی فنوتیپی کرونوباکتر ساکازاکی با سیستم‌های تجاری ممکن است برای سویه‌های جداشده از نمونه‌های غذایی کافی نباشد. روش‌های ژنتیکی مولکولی نشان دادند که چندین سویه شناخته‌شده به عنوان کرونوباکتر ساکازاکی توسط کیت‌های بیوشیمیایی تجاری

www.SID.ir

جدول ۱. آزمایش‌های بیوشیمیایی مورد استفاده برای تمایز کرونوباکتر از Enterobacter spp

تست‌ها	*Cronobacter spp.*	*E. aerogenes*	*E. asburiae*	*E. cancerogenus*	*E. cloacae*	*E. gergoviae*	*E. hormaechei*	*E. pyrinus*	*E. helveticus*	*E. turicensis*
CIT	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
H_2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	-	-	+	-	-	-	v	v	+	+
VP	+	+	-	+	+	+	+	v	-	-
LDC	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
ADH	+	-	v	+	+	-	v	-	-	-
ODC	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
4-NP-α-Glc	+	-	-	-	-	-	-	v	+	+
SAC	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOR	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
RAF	+	+	v	-	+	+	-	-	-	-
ADO	-	+	-	-	v	-	-	-	-	-

افق دانش

CIT: استفاده از سیترات به عنوان تنها منبع کربن؛ H_2S: تولید سولفیدهیدروژن؛ MR: آزمایش متیل‌رد؛ VP: آزمون وژز پروسکوئر؛ LDC: لیزین دکربوکسیلاز؛ ADH: آرژنین دی‌هیدرولاز؛ ODC: اورنیتین دکربوکسیلاز؛ 4-NP-α-Glc: متابولیسم 4-NP-α-گلوکوزید؛ CAS: اسید ساکاروز؛ ARA: اسید از آرابینوز؛ CEL: اسید از سلولوبیوز؛ SOR: اسید از سوربیتول؛ RAF: اسید از رافینوز؛ ADO: اسید از آدونیتول؛ +: ۹۰ تا ۱۰۰ درصد مثبت؛ v: ۲۰ تا ۸۰ درصد مثبت؛ -: کمتر از ۱۰ درصد مثبت است.

به گونه‌های مجزا تعلق دارند. برای تأیید کرونوباکتر ساکازاکی، بیش از یک سیستم تمایز توصیه می‌شود. روش‌های مبتنی بر محاسبات از جمله بیوشیمیایی و داده‌های rDNA 16S پایایی و زمان تشخیص شناسایی را بهبود می‌بخشند [۷۵-۷۳].

تشخیص مولکولی کرونوباکتر ساکازاکی

تکنیک‌های مختلفی برای شناسایی کرونوباکتر ساکازاکی طراحی شده است. آزمون‌های مولکولی کلیدی و مناطق ویژه‌ای از توالی DNA را می‌توان در تمایز دقیق کرونوباکتر ساکازاکی از سایر گونه‌های نزدیک به هم اعمال کرد. تا به امروز، سنجش‌های جداسازی و شناسایی کرونوباکتر ساکازاکی تولید رنگدانه زرد و آزمون α-گلوکوزیداز را به عنوان خصوصیات تمایز مفروض اعمال کرده‌اند. با این حال، این سنجش‌ها می‌توانند منجر به مثبت نادرست فرضی شوند، زیرا گروه‌های غیرانتروباکتریاسه کرونوباکتر ساکازاکی که همچنین برای هر دو این ویژگی‌ها مثبت هستند، هنوز شناسایی نشده‌اند. استفاده از رنگدانه زرد به عنوان یک مشخصه همچنین می‌تواند به دلیل وقوع جدایه‌های غیر رنگدانه کرونوباکتر ساکازاکی و خاصیت گذرا بودن این صفت، منفی کاذب ایجاد کند [۵].

استراتژی‌های پیشگیری

هیچ سیستم نظارت و رهنمود فعالی برای بیماری کرونوباکتر ساکازاکی وجود ندارد. سازمان بهداشت جهانی و سازمان غذا و کشاورزی ملل متحد توصیه‌های زیر را ارائه داده اند: (۱) خطرات مربوط به محصولات شیرخشک غیراستریل را به مراقبین نوزاد اطلاع دهید؛ (۲) شرکای صنعت را تشویق کنید تا طیف وسیعی از گزینه‌های شیرخشک استریل مقرون به صرفه را تهیه کنند؛ (۳) اگر نوزادان نمی‌توانند از شیر مادر تغذیه کنند، تغذیه نوزادان پرخطر با شیرخشک را در نظر بگیرید و (۴) تنظیم یک راهنمای صنعتی برای کرونوباکتر ساکازاکی و سایر اعضای انتروباکتریاسه در شیرخشک نوزاد. برچسب‌های هشداردهنده کارخانه‌ها روی بسته‌های شیرخشک باید تأکید کنند که این محصولات غیراستریل هستند و نیاز به استفاده، تهیه و نگهداری مناسب دارند و گزینه‌های استریل و فرمول مایع در دسترس هستند [۲۶].

www.SID.ir

پاستوریزاسیون در تخریب کرونوباکتر ساکازاکی مؤثر است. اسیدی شدن باعث کاهش غلظت کرونوباکتر ساکازاکی در غذاهای گیاهی و انواع مختلف محصولات شیرخشک شده است [۳۵، ۴۲]. سوء مدیریت بهداشت به دلیل عوامل نادرست زمان و دما و همچنین انتقال باکتری‌ها از طریق مهره‌داران کوچک، حشرات، دست‌ها و تجهیزات، باید در طی مراحل آماده‌سازی، تولید و نگهداری مواد غذایی و نوشیدنی در نظر گرفته شود. کرونوباکتر ساکازاکی ممکن است با فساد غذا مرتبط باشد. لازم به ذکر است که تشخیص کرونوباکتر ساکازاکی موجود در غذا همیشه شاخصی برای سوء مدیریت بهداشت نیست. برای افراد مبتلا به نقص ایمنی اکتسابی یا مادرزادی، به‌ویژه نوزادان، افراد مسن و افرادی که بیماری‌های شدید زمینه‌ای دارند، بروز گسترده کرونوباکتر ساکازاکی و سایر اعضای انتروباکتریاسه در غذا و محیط زیست ممکن است خطری برای سلامتی باشد [۳۵].

نتیجه‌گیری

به دلیل ماهیت فراگیر کرونوباکتر ساکازاکی و رمز و راز پیرامون بیماری‌زایی آن، اقدامات پیشگیرانه توسط والدین، تولیدکنندگان شیرخشک و ارائه‌دهندگان مراقبت‌های بهداشتی در پیشگیری از عفونت‌های مرتبط با کرونوباکتر ساکازاکی مهم خواهد بود. ما تمرکز روی راهکارهای پیشگیرانه ساده مانند ارتقای تغذیه با شیر مادر، درج هشدارهای بسته‌های شیرخشک که ممکن است به کرونوباکتر ساکازاکی آلوده شوند و پرهیز از عمل گرم کردن مجدد شیرخشک را توصیه می‌کنیم . در بزرگسالان باید از مصرف محصولات لبنی بازسازی‌شده در جمعیت‌های سرکوب‌شده سیستم ایمنی خودداری شود. اقدامات احتیاطی پیشگیری‌کننده مناسب باید در تنظیمات ICU (چه در بزرگسالان و چه در نوزادان) مشاهده شود، جایی که عفونت ممکن است شیوع بیشتری داشته باشد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مقاله از نوع فراتحلیل است و نمونه انسانی و حیوانی نداشته است.

حامی مالی

این تحقیق هیچ گونه کمک مالی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های عمومی ، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرد.

تعارض منافع

نویسنده اعلام می‌کند که هیچ تعارض منافعی وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

از آقای حسن خواجه‌ای، برای ویرایش نسخه، تشکر می‌کنیم. همچنین از پشتیبانی دانشگاه علوم‌پزشکی گناباد، گناباد، ایران سپاسگزاری می‌شود.

www.SID.ir

References

[1] Singh N, Goel G, Raghav M. Insights into virulence factors determining the pathogenicity of Cronobacter sakazakii. Virulence. 2015; 6(5):433-40. [DOI:10.1080/21505594.2015.1036217] [PMID] [PMCID]

[2] Mardaneh J, Soltan Dallal MM. Study of cronobacter sakazakii strains isolated from powdered milk infant formula by phenotypic and molecular methods in Iran. Archives of Pediatric Infectious Diseases. 2017; 5(1):e38867. [DOI:10.1128/JCM.42.11.5368-5370.2004] [PMID] [PMCID]

[3] Drudy D, Mullane NR, Quinn T, Wall PG, Fanning S. Enterobacter sakazakii: an emerging pathogen in powdered infant formula. Clinical Infectious Diseases. 2006; 42(7):996-1002. [DOI:10.1086/501019] [PMID]

[4] Iversen C, Waddington M, On SL, Forsythe S. Identification and phylogeny of enterobacter sakazakii relative to enterobacter and citrobacter species. Journal of Clinical Microbiology. 2004; 42(11):5368-70. [DOI:10.1128/JCM.42.11.5368-5370.2004] [PMID] [PMCID]

[5] Iversen C, Lancashire L, Waddington M, Forsythe S, Ball G. Identification of Enterobacter sakazakii from closely related species: The use of artificial neural networks in the analysis of biochemical and 16S rDNA data. BMC Microbiology. 2006; 6:28. [DOI:10.1186/1471-2180-6-28] [PMID] [PMCID]

[6] Leuschner RG, Bew J. A medium for the presumptive detection of Enterobacter sakazakii in infant formula: Inter laboratory study. Journal of AOAC International. 2004; 87(3):604-13. [DOI:10.1093/jaoac/87.3.604]

[7] Cai XQ, Yu HQ, Ruan ZX, Yang LL, Bai JS, Qiu DY, et al. Rapid detection and simultaneous genotyping of Cronobacter spp. (formerly Enterobacter sakazakii) in powdered infant formula using real-time PCR and high resolution melting (HRM) analysis. PLoS One. 2013; 8(6):e67082. [DOI:10.1371/journal.pone.0067082] [PMID] [PMCID]

[8] Iversen C, Lehner A, Mullane N, Marugg J, Fanning S, Stephan R, et al. Identification of 'Cronobacter' spp. (Enterobacter sakazakii). Journal of Clinical Microbiology. 2007; 45(11):3814-6. [DOI:10.1128/JCM.01026-07] [PMID] [PMCID]

[9] Dauga C, Breeuwer P. Taxonomy and physiology of Enterobacter sakazakii. In: Farber J, Forsythe S, Doyle M, editors. Enterobacter sakazakii. Washington D.C.: ASM Press; 2008. [DOI:10.1128/9781555815608.ch1] [PMID] [PMCID]

[10] Wikipedia. Cronus [Internet]. 2021 [Updated 2021 July 7]. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Cronus

[11] FAO/WHO. Enterobacter sakazakii (Cronobacter spp.) in powdered follow-up formula: Microbiological risk assessment series 15. 1 Geneva, Switzerland; 2008. https://www.who.int/publications/i/item/9789241563796

[12] O'Brien S, Healy B, Negredo C, Anderson W, Fanning S, Iversen C. Prevalence of cronobacter species (enterobacter sakazakii) in follow-on infant formulae and infant drinks. Letters in Applied Microbiology. 2009; 48(5):536-41. [DOI:10.1111/j.1472-765X.2009.02562.x] [PMID]

[13] Park JH, Lee YD, Ryu TW. Chang HI. Identification and classification of cronobacter spp. Isolated from powdered food in Korea. Journal of Microbiolog and Biotechnology. 2010; 20(4):757-62. [PMID]

[14] Zhao G, Yuan F, Yang H, Zhao Y, Chen Y. [Taxonomy of Enterobacter sakazakii and the biological characteristics of the new species and genus (Chinese)]. Wei sheng yan jiu= Journal of hygiene research. 2010; 39(2):248-50. [PMID]

[15] Parra-Flores J, Rodriguez A, Riffo F, Arvizu-Medrano SM, Arias-Rios EV, Aguirre J. Investigation on the factors affecting cronobacter sakazakii contamination levels in reconstituted powdered infant formula. Frontiers in Pediatrics. 2015; 3:72. [DOI:10.3389/fped.2015.00072] [PMID] [PMCID]

[16] Jongenburger I, Reij MW, Boer EP, Gorris LG, Zwietering MH. Actual distribution of cronobacter spp. in industrial batches of powdered infant formula and consequences for performance of sampling strategies. International Journal of Food Microbiology. 2011; 151(1):62-9. [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.003] [PMID]

[17] Farmer JJ. My 40-year history with cronobacter/Enterobacter sakazakii-lessons learned, myths debunked, and recommendations. Frontiers in Pediatrics. 2015; 3:84. [DOI:10.3389/fped.2015.00084] [PMID] [PMCID]

[18] Iversen C, Lehner A, Mullane N, Bidlas E, Cleenwerck I, Marugg J, et al. The taxonomy of Enterobacter sakazakii: proposal of a new genus Cronobacter gen. nov. and descriptions of Cronobacter sakazakii comb. nov. Cronobacter sakazakii subsp. sakazakii, comb. nov., Cronobacter sakazakii subsp. malonaticus subsp. nov., Cronobacter turicensis sp. nov., Cronobacter muytjensii sp. nov., Cronobacter dublinensis sp. nov. and Cronobacter genomospecies 1. BMC Evolutionary Biology. 2007; 7:64. [DOI:10.1186/1471-2148-7-64] [PMID] [PMCID]

[19] Chenu JW, Cox JM. Cronobacter ('Enterobacter sakazakii'): Current status and future prospects. Letters in Applied Microbiology. 2009; 49(2):153-9. [DOI:10.1111/j.1472-765X.2009.02651.x] [PMID]

[20] Iversen C, Mullane N, McCardell B, Tall BD, Lehner A, Fanning S, et al. Cronobacter gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of Enterobacter sakazakii, and proposal of Cronobacter sakazakii gen. nov., comb. nov., Cronobacter malonaticus sp. nov., Cronobacter turicensis sp. nov., Cronobacter muytjensii sp. nov., Cronobacter dublinensis sp. nov., Cronobacter genomospecies 1, and of three subspecies, Cronobacter dublinensis subsp. dublinensis subsp. nov., Cronobacter dublinensis subsp. lausannensis subsp. nov. and Cronobacter dublinensis subsp. lactardi subsp. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2008; 58(Pt 6):1442-7. [DOI:10.1099/ijs.0.65577-0] [PMID]

[21] Kim KP, Klumpp J, Loessner MJ. Enterobacter sakazakii bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula. International Journal of Food Microbiology. 2007; 115(2):195-203. [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.029] [PMID]

[22] Davin-Regli A, Lavigne JP, Pagès JM. Enterobacter spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. Clinical Microbiology Reviews. 2019; 32(4):e00002-19. [DOI:10.1128/CMR.00002-19]

[23] Iversen C, Lane M, Forsythe SJ. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of Enterobacter sakazakii grown in infant formula. Letters in Applied Microbiology. 2004; 38(5):378-82. [DOI:10.1111/j.1472-765X.2004.01507.x] [PMID]

[24] Mittal R, Wang Y, Hunter CJ, Gonzalez-Gomez I, Prasadarao NV. Brain damage in newborn rat model of meningitis by Enterobacter sakazakii: A role for outer membrane protein A. Laboratory Investigation. 2009; 89(3):263-77. [DOI:10.1038/labinvest.2008.164] [PMID] [PMCID]

[25] Block C, Peleg O, Minster N, Bar-Oz B, Simhon A, Arad I, et al. Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of Enterobacter sakazakii. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2002; 21(8):613-6. [DOI:10.1007/s10096-002-0774-5] [PMID]

[26] Bowen AB, Braden CR. Invasive Enterobacter sakazakii disease in infants. Emerging Infectious Diseases. 2006; 12(8):1185-9. [DOI:10.3201/eid1208.051509] [PMID] [PMCID]

www.SID.ir

[27] Centers for Disease Control Prevention. Enterobacter sakazakii infections associated with the use of powdered infant formula-Tennessee, 2001. MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2002; 51(14):297-300. [PMID]

[28] Hunter CJ, Petrosyan M, Ford HR, Prasadarao NV. Enterobacter sakazakii: An emerging pathogen in infants and neonates. Surgical Infections. 2008; 9(5):533-9. [DOI:10.1089/sur.2008.006] [PMID] [PMCID]

[29] Healy B, Cooney S, O'Brien S, Iversen C, Whyte P, Nally J, et al. Cronobacter (Enterobacter sakazakii): An opportunistic foodborne pathogen. Foodborne Pathogens and Disease. 2010; 7(4):339-50. [DOI:10.1089/fpd.2009.0379] [PMID]

[30] Cho TJ, Hwang JY, Kim HW, Kim YK, Il Kwon J, Kim YJ, et al. Underestimated risks of infantile infectious disease from the caregiver's typical handling practices of infant formula. Scientific Reports. 2019; 9(1):9799. [DOI:10.1038/s41598-019-46181-0] [PMID]

[31] Jackson EE, Flores JP, Fernández-Escartín E, Forsythe SJ. Re-evaluation of a suspected Cronobacter sakazakii outbreak in Mexico. Journal of Food Protection. 2015; 78(6):1191-6. [DOI:10.4315/0362-028X.JFP-14-563] [PMID]

[32] Gurtler JB, Beuchat LR. Inhibition of growth of Enterobacter sakazakii in reconstituted infant formula by the lactoperoxidase system. Journal of Food Protection. 2007; 70(9):2104-10. [DOI:10.4315/0362-028X-70.9.2104] [PMID]

[33] Hurrell E, Kucerova E, Loughlin M, Caubilla-Barron J, Hilton A, Armstrong R, Smith C, Grant J, Shoo S, Forsythe S. Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the Enterobacteriaceae. BMC Infect Dis. 2009; 9(1):146. [DOI:10.1186/1471-2334-9-146]

[34] Lai KK. Enterobacter sakazakii infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature. Medicine. 2001; 80(2):113-22. [DOI:10.1097/00005792-200103000-00004] [PMID]

[35] Friedemann M. Enterobacter sakazakii in food and beverages (other than infant formula and milk powder). International Journal of Food Microbiology. 2007; 116(1):1-10. [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.018] [PMID]

[36] Kandhai MC, Reij MW, Gorris LG, Guillaume-Gentil O, van Schothorst M. Occurrence of Enterobacter sakazakii in food production environments and households. Lancet. 2004; 363(9402):39-40. [DOI:10.1016/S0140-6736(03)15169-0]

[37] O'Hara CM, Miller JM. Evaluation of the Vitek 2 ID-GNB assay for identification of members of the family Enterobacteriaceae and other non-enteric gram-negative bacilli and comparison with the Vitek GNI+ card. Journal of Clinical Microbiology. 2003; 41(5):2096-101. [DOI:10.1128/JCM.41.5.2096-2101.2003] [PMID] [PMCID]

[38] Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M, Joosten HM. Desiccation and heat tolerance of Enterobacter sakazakii. Journal of Applied Microbiology. 2003; 95(5):967-73. [DOI:10.1046/j.1365-2672.2003.02067.x] [PMID]

[39] Lehner A, Tasara T, Stephan R. 16S rRNA gene based analysis of Enterobacter sakazakii strains from different sources and development of a PCR assay for identification. BMC Microbiology. 2004; 25; 4:43. [DOI:10.1186/1471-2180-4-43] [PMID] [PMCID]

[40] Kanivets VI, Pishchur IN. Bacterial microflora on disinfected sugarbeet seeds. Microbiology. 2001; 70(3):316-8. [DOI:10.1023/A:1010407528520]

[41] Kuklinsky-Sobral J, Araujo WL, Mendes R, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (Glycine max) grown in soil treated with glyphosate herbicide. Plant and Soil. 2005; 273:91-9. [DOI:10.1007/s11104-004-6894-1]

[42] Coulin P, Farah Z, Assanvo J, Spillmann H, Puhan Z. Characterization of the microflora of attieke, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. International Journal of Food Microbiology. 2006; 106(2):131-6. [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.012] [PMID]

[43] Liu Y, Cai X, Zhang X, Gao Q, Yang X, Zheng Z, et al. Real time PCR using TaqMan and SYBR green for detection of Enterobacter sakazakii in infant formula. Journal of Microbiological Methods. 2006; 65(1):21-31. [DOI:10.1016/j.mimet.2005.06.007] [PMID]

[44] Chaves-Lopez C, De Angelis M, Martuscelli M, et al. Characterization of the Enterobacteriaceae isolated from anartisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). Journal of Applied Microbiology. 2006; 101:353-60. [DOI:10.1111/j.1365-2672.2006.02941.x] [PMID]

[45] Lee DG, Kim SJ. Bacterial species in biofilm cultivated from the end of the Seoul water distribution system. Journal of Applied Microbiology. 2003; 95(2):317-24. [DOI:10.1046/j.1365-2672.2003.01978.x] [PMID]

[46] Ling N, Forsythe S, Wu Q, Ding Y, Zhang J, Zeng H. Insights into Cronobacter sakazakii biofilm formation and control strategies in the food industry. Engineering. 2020; 6(4):393-405. [DOI:10.1016/j.eng.2020.02.007]

[47] Casalinuovo F, Rippa P, Battaglia L, Parisi N. Isolation of Cronobacter spp. (Enterobacter sakazakii) from Artisanal Mozzarella. Italian Journal of Food Safety. 2014; 3(1):1526. [DOI:10.4081/ijfs.2014.1526] [PMID] [PMCID]

[48] Caubilla-Barron J, Hurrell E, Townsend S, Cheetham P, Loc-Carrillo C, Fayet O, et al. Genotypic and phenotypic analysis of Enterobacter sakazakii strains from an outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France. Journal of Clinical Microbiology. 2007; 45(12):3979-85. [DOI:10.1128/JCM.01075-07] [PMID] [PMCID]

[49] Camacho-Gonzalez A, Spearman PW, Stoll BJ. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. Pediatric Clinics of North America. 2013; 60(2):367-89. [DOI:10.1016/j.pcl.2012.12.003] [PMID] [PMCID]

[50] Singh VP. Recent approaches in food bio-preservation - a review. Open Vet J. 2018; 8(1):104-111. [DOI:10.4314/ovj.v8i1.16]

[51] Mange JP, Stephan R, Borel N, Wild P, Kim KS, Pospischil A, et al. Adhesive properties of Enterobacter sakazakii to human epithelial and brain microvascular endothelial cells. BMC Microbiology. 2006; 6:58. [DOI:10.1186/1471-2180-6-58] [PMID] [PMCID]

[52] Mullane NR, Whyte P, Wall PG, Quinn T, Fanning S. Application of pulsed-field gel electrophoresis to characterize and trace the prevalence of Enterobacter sakazakii in an infant formula processing facility. International Journal of Food Microbiology. 2007; 116(1):73-81. [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.036] [PMID]

[53] Kim KP, Loessner MJ. Enterobacter sakazakii invasion in human intestinal Caco-2 cells requires the host cell cytoskeleton and is enhanced by disruption of tight junction. Infection and Immunity. 2008; 76(2):562-70. [DOI:10.1128/IAI.00937-07] [PMID] [PMCID]

[54] Kothary MH, Gopinath GR, Gangiredla J, Rallabhandi PV, Harrison LM, Yan QQ, et al. Analysis and characterization of proteins associated with outer membrane vesicles secreted by cronobacter spp. Frontiers in Microbiology. 2017; 8:134. [DOI:10.3389/fmicb.2017.00134] [PMID] [PMCID]

[55] Leclercq A, Wanegue C, Baylac P. Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. Appl

www.SID.ir

Environ Microbiol. 2002; 68(4):1631-8. [DOI:10.1128/AEM.68.4.1631-1638.2002]

[56] Kim H, Ryu JH, Beuchat LR. Effectiveness of disinfectants in killing Enterobacter sakazakii in suspension, dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm. Applied and Environmental Microbiology. 2007; 73(4):1256-65. [DOI:10.1128/AEM.01766-06] [PMID] [PMCID]

[57] Mohan Nair MK, Venkitanarayanan KS. Cloning and sequencing of the ompA gene of Enterobacter sakazakii and development of an ompA-targeted PCR for rapid detection of Enterobacter sakazakii in infant formula. Applied and Environmental Microbiology. 2006; 72(4):2539-46. [DOI:10.1128/AEM.72.4.2539-2546.2006] [PMID] [PMCID]

[58] Rosenfeld Y, Shai Y. Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: Role in bacterial resistance and prevention of sepsis. Biochimica et Biophysica Acta. 2006; 1758(9):1513-22. [DOI:10.1016/j.bbamem.2006.05.017] [PMID]

[59] Matsuura M. Structural modifications of Bacterial lipopolysaccharide that facilitate gram-negative Bacteria evasion of host innate Immunity. Frontiers in Immunology. 2013; 4:109. [DOI:10.3389/fimmu.2013.00109] [PMID] [PMCID]

[60] Jarvis KG, Grim CJ, Franco AA, Gopinath G, Sathyamoorthy V, Hu L, et al. Molecular characterization of Cronobacter lipopolysaccharide O-antigen gene clusters and development of serotype-specific PCR assays. Applied and Environmental Microbiology. 2011; 77(12):4017-26. [DOI:10.1128/AEM.00162-11] [PMID] [PMCID]

[61] Khoshoo V, Edell D, Thompson A, Rubin M. Are we overprescribing antireflux medications for infants with regurgitation? Pediatrics. 2007; 120(5):946-9. [DOI:10.1542/peds.2007-1146] [PMID]

[62] Savino F, Castagno E. Over prescription of antireflux medications for infants with regurgitation. Pediatrics. 2008; 121(5):1070. [DOI:10.1542/peds.2008-0179] [PMID]

[63] Ray P, Das A, Gautam V, Jain N, Narang A, Sharma M. Enterobacter sakazakii in infants: novel phenomenon in India. Indian JMed Microbiol. 2007; 25(4):408. [DOI:10.4103/0255-0857.37351]

[64] Stock I, Wiedemann B. Natural antibiotic susceptibility of Enterobacter amnigenus, Enterobacter cancerogenus, Enterobacter gergoviae and Enterobacter sakazakii strains. Clinical Microbiology and Infection. 2002; 8(9):564-78. [DOI:10.1046/j.1469-0691.2002.00413.x] [PMID]

[65] Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, Karim A, Tribuddharat C, Fennewald M, et al. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. Journal of Clinical Microbiology. 2001; 39(1):175-82. [DOI:10.1128/JCM.39.1.175-182.2001] [PMID] [PMCID]

[66] Gould DJ, Moralejo D, Drey N, Chudleigh JH, Taljaard M. Interventions to improve hand hygiene compliance in patient care. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2017; 9(9):CD005186. [DOI:10.1002/14651858.CD005186.pub4] [PMID] [PMCID]

[67] Bar-Oz B, Preminger A, Peleg O, Block C, Arad I. Enterobacter sakazakii infection in the newborn. Acta Paediatr. 2001; 90(3):356-8. [PMID]

[68] Kent RM, Fitzgerald GF, Hill C, Stanton C, Ross RP. Novel approaches to improve the intrinsic microbiological safety of powdered infant milk formula. Nutrients. 2015; 7(2):1217-44. [DOI:10.3390/nu7021217] [PMID] [PMCID]

[69] Farmer JJ III. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. In: MurrayPR, editors. Manual of cinical microbiology. 7th ed. Washington DC: ASM Press Inc; 1999. https://www.worldcat.org/title/manual-of-clinical-microbiology/oclc/39914150

[70] Stephan R, Van Trappen S, Cleenwerck I, Vancanneyt M, De Vos P, Lehner A. Enterobacter turicensis sp. nov. and Enterobacter helveticus sp. nov., isolated from fruit powder. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2007; 57(Pt 4):820-6. [DOI:10.1099/ijs.0.64650-0] [PMID]

[71] Gebremariam A. Neonatal meningitis in Addis Ababa: A 10-year review. Ann Trop Paediatr. 1998; 18(4):279-83. [DOI:10.1080/02724936.1998.11747960]

[72] Restaino L, Frampton EW, Lionberg WC, Becker RJ. A chromogenic plating medium for the isolation and identification of Enterobacter sakazakii from foods, food ingredients, and environmental sources. Journal of Food Protection. 2006; 69(2):315-22. [DOI:10.4315/0362-028X-69.2.315] [PMID]

[73] Ball G, Mian S, Holding F, Allibone RO, Lowe J, Ali S, et al. An integrated approach utilizing artificial neural networks and SELDI mass spectrometry for the classification of human tumours and rapid identification of potential biomarkers. Bioinformatics. 2002; 18(3):395-404. [DOI:10.1093/bioinformatics/18.3.395]

www.SID.ir