DOI: http://dx.doi.org/10.21123/bsj.2017.14.2.0279

الكشف عن جين *zpx* في بكتريا *Cronobacter sakazakii* المعزولة من عينات سريرية لاطفال عراقيين دون عمر السنتين

م .م. ذاريات عبدالرحمن مطلك أ. م. د. لمى عبدالهادي زوين

قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، ابن الهيثم، جامعة بغداد، بغداد، العراق.

استلام البحث 2016/7/17
قبول النشر 2016/11/24

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

الخلاصة :

شملت الدراسة جمع 200 عينة من الاطفال الرضع باعمار مختلفة دون عمر السنتين تضمنت (50 عينة من كل من سائل النخاع الشوكي Cerebrospinal fluid، دم Blood،الخروج Stool والادرار Urine) للمدة من الاول من ايلول الى الاول من كانون الثاني لعام 2015 ،من مستشفى مدينة الطب (حماية الاطفال)ومستشفى الطفل المركزي (وزارة الصحة العراقية ، دائرة صحة بغداد) وان العزلات البكتيرية التي تم عزلها أخضعت للفحوصات الزرعية، والمجهرية، والكيموحيوية، وشُخِّصت باستعمال نظام Vitek-2 وبينت النتائج حصول تلوث بنسبة 6.5% في العينات السريرية قيد الدراسة، اذ شُخِّصت المستعمرات التي أعطت اللون الوردي على الوسط الزرعي MacConkey agar واللون الاصفر الذهبي على وسط Trypton Soy agar واللون الاخضر على الوسط الزرعي Biriiltent Enterobacter sakazakii agar وأعطت أحتمالية 99% في جهاز Vitek-2 وكانت جميعها تعود لبكتريا *Cronobacter sakazakii*. إذ أمكن الحصول من هذه العينات على (13) عزلة موزعة بواقع (6) عزلات من عينات سائل النخاع الشوكي وبنسبة تلوث 12% و(7) عزلات من عينات الدم وبنسبة تلوث 14% و لم يتم الحصول على البكتريا في عينات الخروج والادرار.تم إجراء الكشف الجيني لجين *zpx* الذي يعد احد عوامل الضراوة الذي يشفر الى أنزيمات Proteases وتبين من النتائج وجود هذا الجين في 13 عزلة وبنسبة 100%

الكلمات المفتاحية : بكتيريا *Crobobacter sakazakii* ، خروج، إدرار، دم، سائل نخاع شوكي، جين *zpx*

المقدمة:

ان بكتيريا*C.sakazakii* المعروفة سابقًا باسم (*Enterobacter sakazakii*) إذ ينتمي هذا الجنس الى العائلة المعوية Enterobactereacea وتتصف بكتيريا *C.sakazakii* بكونها سالبة لصبغة كرام Gram negative، وتكون الخلايا البكتيرية عصوية الشكل Rod shape ،غير مكونة للسبورات ، متحركة بوساطة الاسواط المحيطية Peritrichous flagella، متحملة للضغط الازموزي، وتكون محفظة Formation of capsul، ومن صفاتها الأخرى أنها بكتيريا لاهوائية اختيارية Facultative anaerobic، وتكون سالبة لفحوصات Indol، Oxidase وموجبة لفحص Catalase، ومن صفاتها المميزة أنتاجها لأنزيم Glucosidase لذا أستعمل هذا الأنزيم بوصفهِ صفة تفريقية للنوع على وسط Chromogenic agare[1] وانواع جنس *Cronobacter* تنمو في درجة حرارة تتراوح بين 6-45 °م والدرجة المثلى للنمو 37°م[2]. تتمايز بكتريا *C.sakazakii* المتواجدة في حليب الاطفال المجفف بتحملها الحراري Thermal Tolerance الذي يتفاوت ما بين 58 °م لمدة 0.4 دقيقة[2] الى 71 °م لمدة 2.6دقيقة [3].أما مقاومة البكتريا للجفاف فتتمايز البكتريا بمقاومتها العالية مقارنة بمجاميع العائلة المعوية Enterobacteriacae [4] . وأشار [5] إلى أن وقت تضاعف الجين في البكتريا 40 دقيقة في درجة حرارة 23 °م و 75 دقيقة عند درجة حرارة 25°م. وتظهر مستعمرات بكتريا *C.sakazakii* صفراء اللون على وسط Trypton soy agar((TSA وذلك لانتاجها صبغة Yellow pigment أذ يتأثر أنتاج الصبغة بدرجة حرارة الحضن أذ تنتج صبغة صفراء لامعة بعد 24

ساعة من الحضن وبدرجة حرارة 25 م° وهي أكثـــر من درجة 36م° ومستعمرات ذات حجم يتراوح بين (1-2)ملم و (2-3) ملم لكـــلتا الدرجتين على التوالي[6] سجل [7] نسبة وفيات تتراوح بين 40-80 % فـي الأطفال الرضع نتيجة إصابتهم ببكتيريا *C. sakazakii* ان هذه البكتيريا الانتهازيـة الممرضة هي الاكثر شيـوعا في إصابة الاطفال الذين يعانـون من النقص المنـاعي وخاصة حديثـي الولادة[8]. تمتلك البكتريا العديـد من عوامل الضراوة اهمها افرازها للسم المعويEnterotoxin [9] تكوين الاغشية الحيويـة Biofilms وامتلاكها جين*fliD* و جين *ompA* التي تعد من عوامل الضراوة [10 و11 و 12]. من عوامل الضراوة الأخرى انتاجها الانزيمات المحللة للبروتين (Proteases) الذي يشفر له جين يطلق عليه *zpx*، لذا يُعَدُّ جين *zpx* من عوامل الضراوة المهمة الذي تمتلكه بكتريا *C.sakazakii* إذ اشار[13] إلى ان تشوه خلايا المضيف وتحول شكلها يحدث بفعل انزيمات البروتيز Proteases ولاسيما الانزيمات المعدنية metalloprotease التي تمتلك ذرة معدن الزنك (Zn) في موضعها الفعال، و اشار [14]الى وجود هذه الانزيمات في بكتريا *Cronobacter* واحداثها للتشوه في خلايا المبيض الهامستر الصيني وقدرتها على تحلل الكولاجين وإحداثه للمرض بسبب عبورها خلال حـاجز الدماغ الدموي – Blood Brain Barrier (BBB)او تدميـــــرها لخلايا حديثي الولادة مـــع تنخـــــر الأمعاء [15] وذكر [16] أن من أهم أعــراض الإصابة بهــذه البكتريا حدوث إسهال Diarrhoea ونوبات عصبية وارتفاع في درجات الحرارة أذ تسبب هذه البكتريا مرض السحايا Meningitis وتنخر الامعـــــاء Necrotizing enterocolitis وتجرثم الدم Septicemia عنـد الاطفـال الرضع [17]ولاسيما الأطفال الذين تصل أعمارهم أقل من 28 يـومًا مقارنة بالأطفال الأكثر نضجا والأطفال حديثي الولادة والذين تبلغ أوزانهم 2.5 كيلوغرام. [18]. لذا هدفت الدراسة الى: عزل وتشخيص بكتيريا *C.sakazakii* من عينات سريرية مختلفة لأطفال دون عمر السنتين والتحري عن عوامل الضراوة ومنها جين *zpx*.

المواد وطرائق العمل :

***جمع العينات:**

جمعت 200 عينة من مصادر سريرية مختلفة من مجمع مدينة الطب (مستشفى حماية الاطفال) ومستشفى الطفل المركزي للمدة من 1-9-2015 لغاية 1-12-2015 شملت (50 عينة خروج Stool و 50 عينة دم Blood و 50 عينة ادرار Urine،50 عينة سائل نخاع شوكي Cerebrospinal fluid) . جمعت العينات مباشرة في المستشفيات المذكورة ولم يتم نقلها الى المختبر الا بعد زراعتها كما مذكور في فقرة (زرع العينات).

الاوساط الزرعية:

حُضِّرت الأوساطُ الزرعيةُ (Brain Heart infusion broth(BHIB) و MacConkey agar و Trypton soy agar(TSA) (BESA) (Brilliant Enterobacter sakazakii agar) بحسب تعليمات الشركة المصنعة (Oxiod) وعُقِّمت جميعُ هذه الاوساط الزرعية بوساطة جـهاز المـؤصدة بـدرجــة حـــرارة (121مْ) وضغـط 15) باوند /أنج) لمدة (15) دقيقة. واستعمل وسط BHIB للتنشيط ووسط MacConkey agar (وسط تفريقي) ووسط TSA (وسط تفريقي) ووسط BESA (وسط تشخيصي).

زرع العينات:

زُرعت كل من عينات الدم Blood وسائل النخاع الشوكي CSF على الوسط الزرعي السائل Brain Heart infusion broth وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م ، بعدها زرعت على وسط MacConkey agar ، اما عينات الخروج وعينات الادرار فزرعت مباشرة على وسط MacConkey agar وحضنت لمدة 24 ساعة أيضًا بدرجة 37م، بعدها زُرِعت جميع العينات على وسط Trypton soy agar وحضنت بدرجة حرارة 25 م° ولمدة 72 ساعة، وأخيرًا زُرعـت على وسط Brilliant Enterobacter sakazakii agar وحضـنـت بدرجــة 37م° ولمدة 24 ساعة بحسب ما أشار اليهِ [19].

الاختبارات الكيموحيوية

Biochmical test

تم أجراء الاختبارات الكيموحيوية Biochemical test المعتمدة لتمييز بكتيريـا *C.sakazakii* من الانواع البكتيرية الأخرى وشملت الأحماض الامينية (Lysin , Ornithin , Ariginine) والسكريـــــــات (Raffinose , D-Melibiose , L-Rhamnose) وايضاً فحص (Indole و Catalase و Oxdiase)وبحسب ما جـــاء في [20] .

التشخيص بعدة التشخيص Vitek- 2

تم تشخيص العينات بمختبر الصحة المركزي باستعمال جهاز الفايتك Vitek-2(American) أذ يتكون من مكونين أساسيين هما الالة Instrument وجهاز الكمبيوتر، والآلة تتكون من خمسة مكونات أساسية هي لوحة التحكم Keypad ،باب الملأ Fill Door ، باب التحميـل Load Door ، باب دخــــــول المستعمل User access door باب النفايات Waste Door .

التشخيص الجزيئي:

- استخلاص DNA:

استعملت عدة لاستخلاص DNA الجينومي Genomic DNA mini Kit الذي جهزته الشركة Geneaid (Thailand) للعينات البكتيرية المعزولة. البادئ المستعمل في تفاعل البلمرة المتسلسل PCR استعمل البادئ الموضح في الجدول (1) لغرض الكشف عن جين *zpx* كما جاء في [21] .

جدول (1) البادئ المستعمل في الدراسة

المصدر	الناتج (bp)	Primer sequence (5′–3′) تتابع البادئ		اسم الجين
[21]	94	GAAAGCGTATAAGCGCGATTC	F	*Zpx*
		GTTCCAGAAGGCGTTCTGGT	R	

الكشف عن جين *zpx* باستعمال جهاز تضاعف البلمرة المتسلسل (PCR) لبكتريا *C.sakazakii* :

حُضِّر خليط تفاعل PCR للجين(*zpx*) بخلط 12.5 مايكروليتر من GO Taq Green Master Mix والمجهز من الشركة Promegaو 2 مايكروليتر من template DNA و1 مايـــــكرو ليتر من F-Primer و 1 مايكروليتر من R-Primerو 8.5مايكروليتر من الماء المقطر اللأيوني المعقم Nuclease-free water والمجهز من شركة Promega، إذ يصبح الحجم النهائي للخليط 25 مايكروليتر ، بعد ذلك مزجت محتويات أنابيب PCR جيدًا باستعمال المازج Vortex ثم وضعت في جهاز PCR وبرمج الجهاز للكشف عن الجين .

برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

ضبطت ظروف التضاعف للتحري عن جين *zpx* بحسب ما ذكـــر [21] واتُّبِعت الخطوات الآتية:

الوقت	عدد الدورات	درجة الحرارة	مراحلPCR
دقيقتين	دورة واحدة	95 م°	-1مرحلة مسخ الدنا الأولي Initial Denaturation
30ثانية 30ثانية دقيقة	35 دورة	95م° 62 م° 72م°	-2مرحلة مسخ الدناDenaturation -3مرحلة الالتحام Annealing -4مرحلة الاستطالة Extension
10دقيقة	دورة واحدة	72 م°	-5مرحلة الاستطالة النهائية Final Extension
مستمرة	_	4م°	-6مرحلة السيطرةHold

- الترحيل الكهربائي :

اجري الترحيل الكهربائي للدنا المستخلص DNA ولفصل جزيئاته المختلفة الحجم بحسب ما جاء في [22]

النتائج والمناقشة :

بينت نتائج العزل بعد ان زرعت العينات على وسطMaCconkey agar وشُخِّصت بعدها بوصفهِ تشخيصًا أولـيًّا على وسط TSA وعلى وســـط BESA، وحددت الصفات المزرعية للمستعمرات والصفات المجهرية للخلايا البكتيرية، ومن ثم تــــم التشخيص باستعمال الفحوصات الكيموحيوية Biochmical test الخاصة بالبكتريا للتعـــرف على النوع ، فضلا عن التشخيص النهائي والتأكيدي باستعمال جهاز الفايتك Vitek-2 لل (200) عينة وتبين ان هناك 13 عينة اعطت نتيجة موجبة لبكتيريا *C.sakazakii* وبنسبة 6.5% فيما كانت هنالك 187 عينة أعطت نتيجة سالبة وبنسبة 93.5% وكما في الشكل (1)

شكل (1) نسبة وُجُود بكتيريا *C.sakazakii* في العينات السريرية

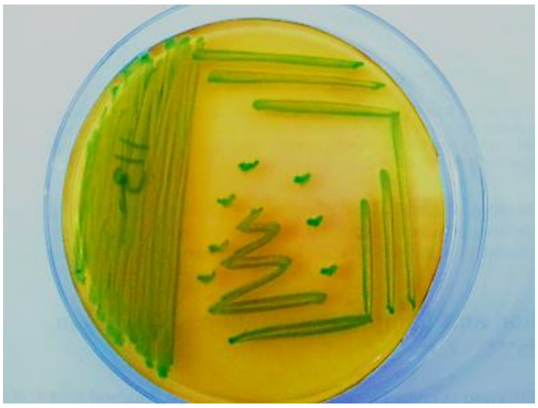
إذ تم الحصول على 6 عزلات من سائل النخاع الشوكي وبنسبة (12%) و7 عزلات من الدم وبنسبة (14%) تعود الى بكتيريا *C.sakazakii* ولم يتم الحصول على البكتيريا من عينات الخروج والادرار وكما مبين في الجدول (2)

جدول (2) يبين مصدر عزلات بكتيريا *C.sakazakii* وعدد عزلات كل مصدر والنسبة المئوية للعزلات السريرية

ت	مصدر العزلة	عدد العينات	C.sakazakii	
			العدد	النسبة المئوية
1	**سائل النخاع الشوكي CSF**	50	6	12
2	**الدم Blood**	50	7	14
3	**خروج Stool**	50	0	0
4	**أدرار Urine**	50	0	0
العدد الكلي		200	13	%26

أمَّا الجدول (3) فيُبَيِّنُ الفحوصات المزرعية لبكتيريا *C.sakazakii* اذ ظهرت العزلات باللون الوردي على وسط MacConkey agare وهذا يدل على انها بكتيريا مخمرة لسكر اللاكتوز وباللون الاصفر الذهبي Yellow pigment gold على وسط TSA كما في الشكل (A2) ، أما عند زراعتها على وسط BESA فقد ظهرت باللون الاخضر كما في الشكل (B2) ، وتمايزت المستعمرات بالشكل الدائري بأنها ذات رأس دبوسي معتدلة الحافة وتعـود مثل هذه الصفات الى المستعمرات التي تكونها بكتيريا *C.sakazakii* وهذا ما أشار اليهِ [20].

شكل (A) وسطTrypton soy agar



شكل (B) وسط sakazakii agar Brilliant Enterobacter

شكل (2) يوضح عزلات بكتيريا *C.sakazakii* على وسط TSA (A) وسط BESA(B)

جدول (3) يوضح الفحوصات المزرعية لبكتريا *C.sakazakii* المعزولة من عينات سريرية:

العزلة	MacConkey	TSA	BESA
B1	+	Yellow	Green
B2	+	Yellow	Green
B3	+	Yellow	Green
B4	+	Yellow	Green
B5	+	Yellow	Green
B6	+	Yellow	Green
B7	+	Yellow	Green
CSF1	+	Yellow	Green
CSF2	+	Yellow	Green
CSF3	+	Yellow	Green
CSF4	+	Yellow	Green
CSF5	+	Yellow	Green
CSF6	+	Yellow	Green

Blood:B دم ، csf: Cerebrospinal fluid سائل نخاع شوكي ، (+) مخمرة لسكر اللاكتوز على وسط MacConkey

ثُمَّ صُبغت الخلايا البكتيرية بصبغة كرام، اذ تمايزت بكونها خلايا عصوية الشكل صغيرة تصطبغ بالصبغة السالبة لصبغة كرام، تكون خلاياها بشكل مفرد او ثنائية الشكل، غير مكونة للسبورات [5]. ثم شُخصت العزلات البكتيـرية بأجراء الاختبارات الكيموحيوية وبحسب ما جاء في [20] وكما مبين في الجدول (4)

جدول (4) يوضح الاختبارات الكيموحيوية لبكتيريا *C.sakazakii*

تخمر السكريات			الاختبارات						العزلة
Raffinose	D-Melibiose	L-Rhamnose	Ariginine	Ornithine	Lysin	Catalase	Oxdiase	Indol	
A	A	A	_	+	_	+	_	_	B1
A	A	A	_	+	_	+	_	_	B2
A	A	A	_	+	_	+	_	_	B3
A	A	A	_	+	_	+	_	_	B4
A	A	A	_	+	_	+	_	_	B5
A	A	A	_	+	_	+	_	_	B6
A	A	A	_	+	_	+	_	_	B7
A	A	A	_	+	_	+	_	_	CSF1
A	A	A	_	+	_	+	_	_	CSF2
A	A	A	_	+	_	+	_	_	CSF3
A	A	A	_	+	_	+	_	_	CSF4
A	A	A	_	+	_	+	_	_	CSF5
A	A	A	_	+	_	+	_	_	CSF6

(-) يدل على الاختبار السالب ،(+) يدل على الاختبار الموجب ،(A) يدل على أنتاج الحامض من السكر

B : دم Blood ، CSF: سائل نخاع شوكي Cerebrospinal fluid

اذ يبين الجدول (4) الاختبارات الكيموحيوية اذ اعطت جميع عزلات بكتيريا *C.sakazakii* فحصا سالبا لاختبار الاندول واختبار الاوكسيديز فيما أعطت العزلات فحصا موجبا لاختبار الكاتاليز، وأعطت فحصا موجبا للحامض الأميني أيضًا Ornithine و Ariginine مما يدل على انتاجها لانزيم Ornithine decarboxylase و Ariginine decarboxylase، وأعطت فحصا سالبا للحامض الاميني Lysin مما يشير الى عدم انتاجها لانزيم Lysin decarboxylase، وأظهرت جميع العزلات قدرتها على تخمر السكريات (Raffinose و D -Melibiosو Rhamnose) وتكون اللون الاصفر دلالة على قدرتها على أنتاج الحامض من السكر [20] وأستعمل نظام Vitek-2 لغرض تأكيد التشخيص للعزلات البكتيرية المعزولة من العينات السريرية للاطفال دون عمر السنتين، اذ يوفر هذا الجهاز 64 اختبارا من الاختبارات الكيموحيوية المختلفة للعزلات المراد تشخيصها كما مبين في جدول(5) .

جدول(5) يبين نتائج تشخيص بكتريا *C. sakazakii* باستعمال جهاز الفايتك Vitek -2 للعزلة(B1)

well	Test	Biochmical Detalis	Well	Test	Biochmical Detalis
2	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-	32	D-SORBITOL	-
3	ADONITOL	-	33	SCCHAROSE/SUCROSE	+
4	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-	34	D-TAGATOSE	-
5	L-ARABITOL	-	35	D-TREHALOSE	+
7	D-CELLOBIOSE	+	36	CITRATE (SODIUM)	+
9	BETA-GALACTOSIDASE	+	37	MALONATE	-
10	H2S PRODUCTION	-	39	5-KETO-D-GLUCONATE	-
11	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	+	40	L-LACTATE alkalinization	+
12	Glutamyl Arylamidase Pna	-	41	ALPHA-GLUCOSIDASE	+
13	D-GLUCOSE	+	42	SUCCINATE alkalinization	+
14	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	-	43	Beta-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	-
15	FERMENTATION/ GLUCOSE	+	44	ALPHA-GALACTOSIDASE	+
17	BETA-GLUCOSIDASE	+	45	PHOSPHATASE	-
18	D-MALTOSE	+	46	Glycine ARYLAMIDASE	-
19	D-MANNITOL	+	47	ORNITHINE DECARBOXYLASE	+
20	D-MANNOSE	+	48	LYSINE DECARBOXYLASE	-
21	BETA-XYLOSIDASE	+	53	L-HISTIDINE assimilation	-
22	BETA-Alanine arylamidase Pna	-	56	COURMARATE	-
23	L-Proline ARYLAMIDASE	-	57	BETA-GLUCURONIDASE	-
26	LIPASE	-	58	O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+
27	PALATINOSE	+	59	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	-
29	Tyrosine ARYLAMIDASE	-	61	L-MALATE assimilation	-
31	UREASE	-	62	ELLMAN	+
64	L-LACTATE assimilation	-			

وأظهرت نتائج التشخيصVitek -2ان جميع العزلات تعود الى بكتيريا *C.sakazakii* وبنسبة احتمالية 99% كما في الجدول (6)

جدول (6) يوضح نتائج التشخيص بنظام Vitek -2 للبكتيريا المعزولة من العينات السريرية:

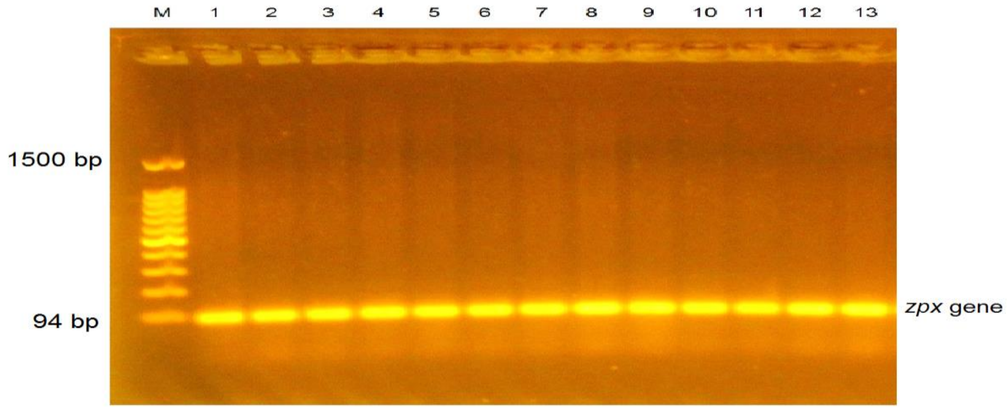
رمز العزلة	التشخيص	الاحتمالية %	الدقة
B1	*C. sakazakii*	99	Excellent
B2	*C. sakazakii*	99	Excellent
B3	*C. sakazakii*	99	Excellent
B4	*C. sakazakii*	99	Excellent
B5	*C. sakazakii*	99	Excellent
B6	*C. sakazakii*	99	Excellent
B7	*C. sakazakii*	99	Excellent
CSF1	*C. sakazakii*	99	Excellent
CSF2	*C. sakazakii*	99	Excellent
CSF3	*C. sakazakii*	99	Excellent
CSF4	*C. sakazakii*	99	Excellent
CSF5	*C. sakazakii*	99	Excellent
CSF6	*C. sakazakii*	99	Excellent

بينت نتائج الدراسة الحالية التي أُجريت على أطفال عراقيين دون عمر السنتين الراقدين في المستشفيات المذكورة في الدراسة ان نسبة وُجُود بكتيريا *C.sakazakii* في الدم كانت 14% في حين كانت 12% بالنسبة لسائل النخاع الشوكي اي من بين 200 عينة من الاطفال دون عمر السنتين كانت هناك 13 حالة اصابة ببكتيريا *C.sakazakii* وبنسبة 26%. وفي دراسة محلية لبكتيريا *C.sakazakii* قام بها [23] أكد وُجُود هذه البكتيريا بنسبة 11.9% في العينات البيئية والسريرية، واشارت دراسة أخرى إلى وجُود بكتيريا *C.sakazakii* في خروج الاشخاص المصابين بالاسهال وبنسبة [24]% 3.37 واكد[25] في دراسة شملت 46 حالة أصابة بالبكتيريا كانت 33 حالة منها مصابة بالتهاب السحايا و12 حالة بتسمم الدم الجرثومي وحالة واحدة مصابة بالتهاب المجاري البولية. كما أكد ان الاطفال الذين يولدون قبل الاوان يكونون أكثر عرضة للاصابة بهذه البكتيريا نتيجة تناول حليب الاطفال الملوث واكثر عرضة لمشاكل الجهاز العصبي . في حين أكدت منظمة الصحة العالمية عام 2006 أن معدل الاصابة السنوي في الولايات المتحدة الامريكية عند الاطفال الرضع والذين تقل اوزانهم عن الوزن الطبيعي كانت 8.7 لكل 100 الف طفل[26]. اما على المستوى العالمي فلا يوجد نظام مراقبة فعال للتغلب على هذا الممرض ، ومع ذلك استطاعت منظمة الصحة العالمية من عام 1961 ولغاية 2008 تسجيل 120 حالة مصابة ببكتيريا *Cronobacter* بين الرضع والاطفال الاقل من عمر 3 سنوات [27] وعلى الرغم من أنه تم الابلاغ عن 120حالة في العالم فقط، ولكن عدد الحالات المصابة بهذه البكتيريا في تزايد [28] وأكدت دراسة أن الاصابة بهذه البكتيريا تهدد حياة الاطفال حديثي الولادة (الرضع الذين تبلغُ أعمارهم 4 أسابيع) [29 ، 30] وقد تؤدي الى الوفاة وبنسبة تتراوح بين 40 - 80% [31، 32]. إن الاصابة ببكتيريا *Cronobacter* يسبب السحايا عند الأطفال الرضع وتكون قاتلة خلال ساعات او أيام من الولادة [33] وان الاطفال الناجون غالبا ما يعانون من اضطرابات عصبية [34]. اذ أشار [35] الى ان نسبة اصابة الاطفال ببكتيريا *C.sakazakii* تصل الى 13% في الاطفال حديثي الولادة، وإن إصابة الأطفال دون عمر السنتين بهذه البكتيريا يعود الى انخفاض اوزانهم وضعف جهازهم المناعي وتغذيتهم على حليب الاطفال المجفف والذي يؤدي الى الاصابة بتنخر الامعاء وبنسبة تتراوح بين 50-10%والاصابة بالتهاب السحايا وبنسبة 80%-40 وهذا ما أشار اليه [36] من أن بكتيريا *Cronobacter* لها القدرة على احداث الاصابة بالتهاب السحايا وتنخر الامعاء وتجرثم الدم، او تنتقل الاصابة من الام الى الطفل في أثناء عملية الولادة القيصرية [37]. في حين ذكر [38 ، 39] أن الإصابة قد تحدث عن طريق المهبل في أثناء الولادة الطبيعية والتي قد تكون *Cronobacter* جزءًا من الالتهابات المهبلية.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن 13 عزلة تعود لبكتيريا *C.sakazakii* تمتلكُ جين *zpx* بنسبةِ 100%، وعند مقارنة حزم DNA المتضاعفة بالدليل الحجمي وجد ان الحزم الناتجة ذات وزن جزيئي bp94 كما في الشكل (3) وتتفق هذهِ النتيجة مع ما حصل عليهِ [22] من أنَّ بكتريا *C.sakazakii* التي عُزلِت من العينات التي قام بدراستها تمتلكُ جين*zpx*. في حين وجد [40] إن 67.7% من بكتريا *C.sakazakii* المعزولة من عينات بيئية تمتلك جين *zpx* مشيراً الى إن السلالات القياسية لبكتريا *C.sakazakii* حاوية على جين *zpx*، أمـا [14] فقد أشار الى وجود جين *zpx* في ثلاث عزلات لبكتريا *C.sakazakii* معزولة من الحليب والبسكويت والتوابل فضلاً عن وجوده في السلالة القياسية وعدم وجوده في ثلاث عزلات، اثنتان منها معزولة من الحليب وواحدة معزولة من Horlicks.

وقد أكّدت دراساتٌ وجود جين *zpx* في البكتريا الذي يشفر الى الانزيمات الحاوية على المعادن metalloprotease وهذه الانزيمات تُنتِجُها عدد من

البكتريا المسببة للأمراض، ومنها بكتريا C.sakazakii،إذ يعملُ هذا الجينُ على تدميرِ المركبات البروتينية، مثل بروتين الكولاجين (Collagen) وبهذا يسببُ تدميرَ أغشية الخلايا البطانية للأوعية الشعرية مِمَّا يؤدي إلى تسرُّبِ مكوِّنات الدَّم إلى محيط الأنسجة، ومن ثَمَّ تُمكِّن المسبِّب المرضي(البكتريا) من عبور حاجز الدماغ الدموي [41] .



شكل (3) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لعزلات بكتريا *C.sakazakii* باستعمال بادئ Primer لجين *zpx* (94 bp)

المصادر:

[1] Turconi, G.; Guarcello, M.; Livieri. C.; Comizzoli, S.; Maccarini, L.; Castellazzi, A.M.; Pietri, A.; Piva, G. and Roggi, C. 2004. Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn—an epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy). *Eur J Nutr*. 43: 191-197.

[2] Iversen, C.; Lehner, A.; Mullane, N.; Bidlas, E.; Cleenwerck, I.; Marugg, J. *et al*. 2007. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of 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., *Cronobacter* genomo species 1. *BMC Evol Biol*. 64, 7: 1471-2148.

[3] Iversen, C and Forsythe, S. 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci Technol*. 14 ,11: 443-454

[4] Iversen, C .Lane, M. and Forsythe, S. J. 2004. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula .*Lett Appl Microbiol*.382–378 :38 .

[5] Lin, L. C. and Beuchat, L. R. 2007. Survival of *Enterobacter sakazakii* in infant cere.al as affected by composition, water activity, and temperature. *Food Microbiol*. 24: 767 – 777.

[6] Breeuwer, P.; Lardeau, A.; Peterz, M. and Joosten, H. M. 2003. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii* .*J Appl Microbiol*.973–967 :95 .

[7] Farmer, J. J.; Asbury, M. A.; Hickman, F. W. and Brenner, D. 1980. The *Enterobacteriaceae* Study Group .*Enterobacter sakazakii*, new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Intl J Sys Bacteriol*. 30: 569-84.

[8] Willis, J. and Robinson, JE. 1988. *Enterobacter sakazakii* meningitis

[16] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2002. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula—Tennessee. 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 51, 14: 297–300.

[17] Giovannini, M.; Verduci, E.; Ghisleni, D.; Salvatici, E.; Riva, E. and Agostoni, C. 2008. *Enterobacter sakazakii*: an emerging problem in paediatric nutrition. *J Int Med Res*.36:394–399.

[18] Gurtler, J. B.; Kornacki, J. L. and Beuchat, L. R. 2005. *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *Int J Food Microbiol*. 104 ,1: 1-34.

[19] Kim, K.; Sik Jang, S.; Ki Kim, S.; Park, J.H.; Heu, S.; and Rye, S. 2008. Prevalence and genetic diversity of *Enterobacter sakazakii* in ingredients of infant foods. *Int. J. of Food Microbiol*. 122:196-203

[20] Food and Drug Administration (FDA). 2012. *Cronobacter*. Bacteriological *Analytic Manual*. chapter. 29:1-11

[21] Kothary, M. H.; McCardell, B. A.; Frazar, C. D.; Deer, D. and Tall, B. D. 2007. Characterization of the zinc-containing metalloprotease encoded by *zpx* and development of a species-specific detection method for *Enterobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol*., 73: 4142-4151.Cited by Jaradat, Z. W.; Ababneh, Q. O.; Saadoun, I. M.; Samara, N. A. and Rashdan, A. M. 2009.

[22] Green and Sambrook. 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4thed. New York.

[23] Al-joubori, Y.S.H. 2014. Isolation and Identification of *Cronobacter sakazakii* and *Enterobacter spp*.in meningitis, necrotizing enterocolitis and infant

in neonates. *Pediatr Infect Dis J*. 7: 196–9.

[9] Naqvi, S.H.; Maxwell, M.A and Dunkle, L.M. 1985. Cefotaxime therapy of neonatal Gram-negative bacillary meningitis. *Pediatr Infect Dis* J. 4: 499– 502.

[10] MacLean, L. L.; Pagotto, F.; Farber, J.M and Perry, M. B. 2009. The structure of the Oantigen in the endotoxin of the emerging food pathogen *Cronobacter* (*Enterobacter*) *muytjensii* strain 3270. *Carbohydrate Res*. 344, 5: 667-671

[11] Hartmann, I.; Carranza, P.; Lehner, A.; Stephan, R.; Eberl, L and Riedel, K. 2010. Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation. *Appl and Environm Microbiol*. 76: 2251e2261

[12] Mittal, R.; Wang, Y.; Hunter, C. J.; Gonzalez-Gomez, I. and Prasadarao N. V. 2009. Brain damage in newborn rat model of meningitis by *Enterobacter sakazakii* : a role for outer membrane protein A. *Lab Invest*.89:263–277

[13] Chenu, J. W. and Cox, J. M. 2009. *Cronobacter*‘) *Enterobacter sakazakii* (’current status and future prospects. *Lett Appl Microbiol*: 49:153-159.

[14] Fakruddin, M. D.; Rahaman, M.; Ahmed, M. M. and Hoque M. D. 2013. *Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii*): An Emerging Food borne Pathogen. *Inter J Bio And Adv Res*., 4,6: 350-359.

[15] Hunter, C.J.; Singasmetty, V.K.; Chokshi, N.K.; Boyle, P.; Camerini, V.; Grishin, A.V.; Upperman, J.S.; Ford, H.R. *et al*. 2008. Enterobacter sakazakii enhances epithelial cell injury by inducing apoptosis in a rat model of necrotizing enterocolitis. *J Infectious Dis*., 198: 586–593.

[32] Friedemann, M. 2007. Enterobacter sakazakii in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *Int J Food Microbiol*.116:1–10.

[33] Muytjens, H. L.; Zanen, H. C.; Sonderkamp, H. J., Kolle´e, L. A., Wachsmuth, I.K. and Farmer, J.J. III. 1983. Analysis ofight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii. J Clin Microbiol* .18: 115–120.

[34] International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 2002 Microorganisms in foods, Vol. 7. Microbiological Testing in Food Safety Management, Chap. 8. Selection of Cases and Attribute plans. New York, NY Kluwer Academic ⁄ Plenum Publishers.

[35] Fiore, A., Casale, M., Aureli, P. 2008. *Enterobacter sakazakii:* epidemiology, clinical presentation, prevention and control. *Ann Ist Super Sanità* . 44, 3: 275-280.

[36] Healy, B.; Cooney, S.; O'Brien, S.; Iversen, C.; Whyte, P.; Nally, J.; Callanan,J. and Fanning,S. 2010. Cronobacter (*Enterobacter sakazakii*): An Opportunistic Foodborne Pathogen. *Food borne pathog dis.*:7,:4.

[37] Zogay, X.; Bokranz, W.; Nimtz, M. and Romlind, U. 2003. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect Immun*.71:4151-8

[38] Hunter, C. J. and Bean, J. F. 2013. *Cronobacter*: an emerging opportunistic pathogen associated with neonatal meningitis, sepsis and necrotizing enterocolitis. J. Perinatol. 33: 581–585.

[39] Yan, Q. Q.; Condell, O.; Power, K.; Butler, F.; Tall, B. D. and Fanning, S. 2012. *Cronobacter* species (formerly known as food in Baghdad. Master Thesis College of Science for women, University of Baghdad.

[24] Mahindroo, J.; Shyam, I.; Mohan, B.; Thakur, S. and Taneja, N. 2016. Cronobacter sakazakii- An unrecognized food borne pathogen, India. *Int J of infect Dis*. 45: 1-47.

[25] Bowen, A.B. and Braden, C.R. 2006. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerg Infect Dis*.12:1185–1189.

[26] FAO/WHO .2006. *Enterobacter sakazakii* and Salmonella in Powdered Infant Formula (Meeting Report). Microbiological Risk Assessment Series 10. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization

[27] FAO/WHO. 2008. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*.) in powdered follow-up formulae: Meeting report, MRA series 15. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization/World Health Organization.

[28] Teramoto, S.; Tanabe, Y.; Okano, E.; Nagashima, T.; Kobayashi, M .And Etoh, Y. 2010. A first fatal neonatal case of *Enterobacter sakazakii* infection in Japan. *Pediatr Int*. 52: 312–313.

[29] Mullane, N. R.; O'Gaora, P.; Nally, J. E.; Iversen, C.; Whyte, P.; Wall, P. G. and Fanning, S. 2008. Molecular analysis of the *Enterobacter sakazakii* O-antigen gene locus. *Appl Environ Microbiol* .74: 3783–3794.

[30] Bar-Oz, B.; Preminger, A.; Peleg, O.; Block, C. and Arad, I. 2001. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. *Acta Paediatr*. 90: 356–358.

[31] Bowen, A. B. and Braden, C. R. 2006. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerg Infect Dis* .12: 1185–1189.

Enterobacter sakazakii) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium. *J Appl Microbiol* .113: 1–15.

[40] Jaradat, Z. W.; Ababneh, Q. O.; Saadoun, I. M.; Samara, N. A. and Rashdan, A. M. 2009. Isolation of *Cronobacter spp*. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing. *BMC Microbiol*., 9, 2.

[41] Nair, M. K. and Venkitanarayanan, K. 2007. Role of bacterial *OmpA* and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Enterobacter sakazakii*. *Pediatr Res*., 62: 664–669.

Detection of *zpx* gene of *Cronobacter sakazakii* isolated from Clinical samples for Iraqi children under Two Years

Assist. Lecturer Tharieyt Abdulrahman Motlag
Assist Prof. Dr. Luma abdal Hady Zwein

Department of Biology, College of Education for Pure Sciences -Ibn Al-Haitham, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.

Received 17/7/2016
Accepted 24/11/2016

Abstract:

The study included 200 samples were collected from children under two years included (50 samples from each of Cerebrospinal fluid, Blood, Stool and Urine) from, (Central Children Hospital and Children's Protections Educational Hospital) The Iraqi Ministry of Health, the Department of Health Baghdad .the period from the first of 2015 September to the first of December 2015, Were obtained isolates bacterial subjected to the cultural, microscopic and biochemical examination and diagnosed to the species by using vitek2 system .The results showed there were contamination in 6.5% of clinical samples. The diagnosed colonies which gave pink color on the MacConkey agar, golden yellow color on the Trypton Soy agar and green color on the Birillent *Enterobacter sakazakii* agar and gave a probability of 99% in the vitek 2 and were identified as *Cronobacter sakazakii.* The identifcation revealed of thirteen isolates, (6) isolated from Cerebrospinal fluid samples and its contamination with percent 12%, (7) isolated from blood samples and its contamination with percent 14% and not isolated bacteria from stool and urine samples. Detection of *zpx* gene showed the presence of this gene in 13(100%)of isolates

Key words: *cronobacter sakazakii,* Stool, Urine, Blood, Cerebrospinal fluid, *zpx* gene.