عزل وتشخيص بكتريا Enterobacter Sakazakii من الأغذية الموجودة في الأسواق المحلية ودراسة تأثير كل من مضادات الحياة ودرجة الحرارة على نموها.

مـــي حاتـــم شفيـــق

قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة بغداد.

الخلاصة

اجري هذا البحث لغرض دراسة Enterobacter sakazakii المسببة للعديد من الأمراض. حيث عزلت هذه البكتريا من العديد من الاغذية المحلية وشخصت بكونها مستعمرات صفراء على وسط TSA وموجبة لفحص الأوكسيديز Oxidase Positive الذي يميزها عن بكتريا Enterobacter cloacae. وقد لوحظ في هذه الدراسة إن البكتريا كانت مقاومة لدرجات الحرارة العالية ولحد 60°م أما فوق هذه الدرجة أي في 65°م فقد تم القضاء على البكتريا بعد مرور 15 دقيقة من الحضانة، كما لوحظ إن البكتريا تتحمل درجت الحرارة الواطئة فقد بقيت البكتريا حية عند الحضن في درجة –8°م ولمدة 24 ساعة. كما كانت البكتريا مقاومة لكل المضادات الحياتية المستخدمة ما عدا مضادات Nalidixic acid و Kanamycin و riphampin فقد كانت البكتريا في هذه الدراسة حساسة لها.

المقدمة

تعود بكتريا Enterobacter sakazakii إلى عائلة Enterobacteriaceae وهي بكتريا عصوية سالبة لصبغة گرام، ومن النوع المنتهز للفرص الممرضة (opportunistic pathogen) المنتشرة في الطبيعة [1]. وكانت تسمى سابقاً بـ E. cloacae ذات الصبغة الصفراء yellow – pigment حتى عام 1980 عندما أعيد تسميتها بـ Enterobacter sakazakii [2]. إذ لوحظ هذه البكتريا هي السبب في إصابة الأطفال الرضع الحديثي الولادة بأمراض مثل تعفن الدم (sepsis)، سحايا (meningitis)، والتهاب المعي والقولون (entrocolitis) والتنخر أو الموت الموضعي necrosis وكانت نسبة الوفيات عالية إذ تراوحت ما بين 40-80% [3]. وتتواجد هذه البكتريا في العديد من الأغذية كاللحوم والخضروات والفواكه وعصائرها والحليب ومنتجاته [4، 5]. وكما عزلت البكتريا من العينات السريرية للمرضى البالغين الراقدين في المستشفيات والمصابين بأمراض مثل التهاب المجاري البولية، التهاب شغاف القلب، التهاب المفاصل القيحي، التهاب العظم والتهاب العيون [6]. إذن دعت الحاجة للسيطرة على نمو هذه البكتريا باستخدام الوسائل الفيزيائية والكيمياوية المتوفرة.

المواد وطريقة العمل

تم أخذ عينات غذائية مختلفة من الأسواق المحلية لمدينة بغداد على أن لا يقل وزنها عن 500 غرام للعينة الواحدة.

تمت طريقة العزل حسب ما جاء في [2] وكالآتي:

1) بإجراء الفحص الافتراضي (presumptive test) حيث تؤخذ 3 دوارق معقمة ويضاف لها عينة غذائية وبوزن 100 غم، 10غم، 1غم وعلى التوالي ثم يضاف لها ماء مقطر مسخن إلى درجة 45-50°م وبحجم 2 لتر، 250 مل، 125 مل وعلى التوالي، تهز الفلاسكات حتى تتجانس ثم تحضن ليلاً (over night) بدرجة حرارة 36°م.
2) يؤخذ 10 مل من كل عالق ويضاف له 90 مل من وسط EE broth (Enterobacteriaceae enrichment) وتحضن بدرجة 36°م إلى اليوم التالي.
3) يؤخذ 0.1 من العالق في الخطوة (2) وينشر بطريقة النشر المباشر (spreading) على وسط VRBG الصلب (Violet red bile glucose Agar) وتحضن ليلاً بدرجة 36°م.
4) تؤخذ مسحات من الوسط السابق وتخطط على وسط VRBG الصلب وبطريقة التخطيط (streaking) للحصول على مستعمرات معزولة نقية

(isolated colonies). تحضن الأطباق بدرجة 36°م إلى اليوم التالي.

5) يتم اختيار المستعمرات المشكوك فيها من الوسط السابق وتزرع على وسط (Tryptic soya Agar) بطريقة التخطيط المباشر (streaking) وتحضن بدرجة 25°م ولمدة 48-72 ساعة.

6) إجراء فحص الأوكسيديز (oxidase test) للمستعمرات المعزولة كفحص تأكيدي.

تم إجراء الاختبارات الآتية على المستعمرات المعزولة :

اختبار قدرة البكتريا على النمو في درجات حرارية عالية

أخذت مجموعة من الأنابيب تحتوي كل منها على 9 مل من الدارئ المعقم (potassium phosphate buffer) وأضيف لها 1 مل من عالق البكتريا المزروعة في وسط نقيع القلب والدماغ السائل (Brain heart infusion broth) وبعمر 24 ساعة، تم حضن الأنابيب في حمام مائي وبالدرجات الحرارية الآتية: 37°م للسيطرة ثم 45، 55، 60، 65°م وللفترات الزمنية : 15، 30، 45، 60، 75 دقيقة، تم خلالها التعداد الكلي للخلايا باستخدام ماء الببتون (peptone water) للتخفيف ووسط Tryptic soya Agar لتعداد الخلايا [7].

اختبار التعرض لدرجات الحرارة الواطئة

أجريت نفس التجربة السابقة نفسها الخاصة بالحرارة العالية ولكن تمت في درجات حرارية وواطئة وهي 8، 4، 0، -4، -8°م وحسب [7].

اختبار الحساسية للمضادات لحياتية Antibiotics

اجري اختبار الحساسية حسب [8] واستخدمت أقراص المضادت الحياتية المجهزة من شركة Oxoid والمقاسة بالملغم/ قرص.

سجلت النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط (inhibition zone) بالملم حول القرص وقورنت بالمعدلات القياسية لقطر منطقة التثبيط للمضادات الحياتية[9].

جدول رقم (1)

يوضح المضادات الحياتية المستخدمة وتراكيزها.

	اسم المضاد	الرمز	تركيز المضاد المستعمل mg/ml		اسم المضاد	الرمز	تركيز المضاد المستعمل mg/ml
1	Nalidixic acid	Nal.	25	8	Ampicillin	Amp.	25
2	Kanamycin	Kan.	25	9	Amoxicillin	Amo.	25
3	riphampin	riph.	30	10	Penicillin	Pen.	25
4	Bacitracin	Baci.	25	11	Gentamycine	Gen.	10
5	Erythromycin	Ery.	30	12	Trimethprime	Trim.	25
6	Cephalothin	Cephalo.	30	13	Cefataxime	Cefa.	30
7	Vancomycin	Van.	25	14	Cephaxin	Cephax.	30

النتائج والمناقشة

عزل البكتريا وتشخيصها

أ) تظهر مستعمرات E. sakazakii بلون ارجواني purple محاطة بهالة ارجوانية من ترسب أحماض الصفراء purple halo of precipitated bile acids على وسط VRBG الصلب [2].

ب) تظهر مستعمرات E. sakazakii على وسط TSA Agar صفراء اللون (Yellow pigmented colonies) [2].

ج) تعطي البكتريا فحصاً موجباً للأوكسيديز Oxidase test وهو فحص مهم لأنه يفرق بين بكتريا E. sakazakii الموجبة للفحص وبكتريا E. cloacae السالبة للفحص.

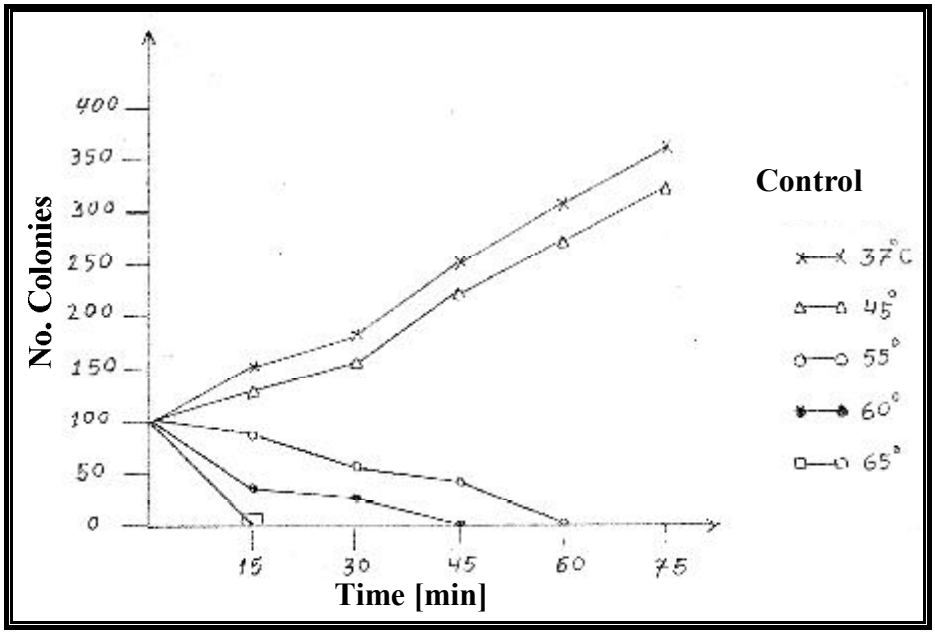
جدول رقم (2)

النسبة المئوية لعزلات بكتريا Enterobacter sakazakii المعزولة من مواد غذائية مختلفة.

	المـــــادة الغذائيـــة	عدد العينات	عدد عزلات Enterobacteriaceae	عدد عزلات E. sakazakii	النسبة المئوية
1	اللحوم بأنواعها : لحم مثـروم (minced meat)، لحـم طـازج (raw meat)، همبركر، دجاج.	100	12	6	50
2	خضروات (Vegetables) : خـس (cabbage)، جـزر (carot)، خيـار (cucumber)، خضروات متنوعة.	100	40	35	90
3	الفواكه (Fruit) : تفـاح (apple)، طماطـة (tomato)، رقـي (water melon)، البطـيخ الأصـفر (cantaloupe).	50	20	8	40
4	الحليب الخام ومنتجاته : حليب خام، جبن عرب محلي.	25	10	5	50

قدرة بكتريا E. sakazaki على النمو في درجات حرارية عالية

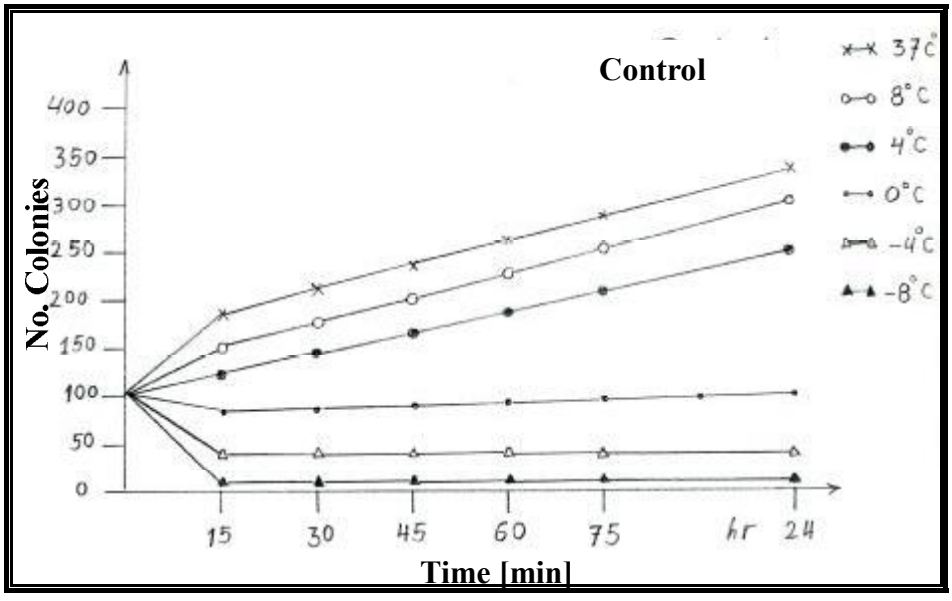
يلاحظ من شكل رقم [1] إن هذه البكتريا كانت مقاومة لدرجات الحرارة 37 و 45°م، وعلى التولي حيث اسـتمر التعداد البكتيري بالزيادة حتى نهاية فترة الحضانة مما يثبت إن هذه الدرجات كانت ملائمة جداً للنمو. أما فـي درجـة 55، 60°م فأن التعداد البكتيري يقل بزيادة فترة الحـضانة حيث لم يكشف عن نمو بكتيري بعد 45 – 60 دقيقة مـن النمو وعلى التوالي. أما عند اسـتخدام درجـة 65°م فقـد اختفى النمو بعد مرور 15 دقيقة حضانة، وهذا يطابق مـا ذكره [3، 4، 5] من إن هذه البكتريا تتحمل وتقاوم درجات الحرارة العالية التي تتراوح بين 50 – 60°م ولهذا صنفت هذه البكتريا ضمن البكتريـا المتحملـة للحـرارة العاليـة (Thermotolerant) أما في الدرجات الحرارية أعلى مـن 60°م فأن هذه البكتريا تقتل وهذا ما لوحظ فـي عمليـات البسترة (Pasteurization). أما فـي درجـات الحـرارة المعتدلة 37°م و 45°م فقد ذكر [10] إن هذه البكتريا تتمكن من العيش في درجات حرارية تتراوح بـين 3.6–47.6°م والتي تمثل درجات الحرارة الدنيا (minimum) والقصوى (maximum) لهذه البكتريا وعلـى التـوالي أمـا درجـة الحرارة الفضلى (optimum) لها فهي 39.4°م.



شكل رقم (1) تأثير درجات الحرارة العالية على نمو بكتريا Enterobacter sakazakii.

قدرة بكتريا E.sakazaki على النمو في درجات حرارية واطئة

يلاحظ من شكل [2] إن البكتريا استمرت بالنمو في درجات الحرارة الواطئة 8 و 4°م وعلى التوالي وحتى نهاية فترة الحضانة ولكن التعداد البكتيري كان أقل مقارنة بالسيطرة وهذا يوافق ما ذكره [11] من إن البكتريا تبقى حية ولعدة أيام في الفواكه والخضر المخزونة في درجة حرارة الثلاجة (4°م) حيث توفر المواد الغذائية حماية للبكتريا من تأثير درجات الحرارة الواطئة. أما في درجات الحرارة الأوطأ من ذلك (0، 4-، 8-) فأن التعداد البكتيري يبدأ بالنقصان وحتى نهاية فترة الحضانة وذلك لأن درجات الحرارة الواطئة تؤدي إلى تثبيط عمل الإنزيمات الخاصة بالنمو [12]، كما لاحظ [11] زيادة لتعداد البكتيري عند تخزين الخس في الثلاجة.



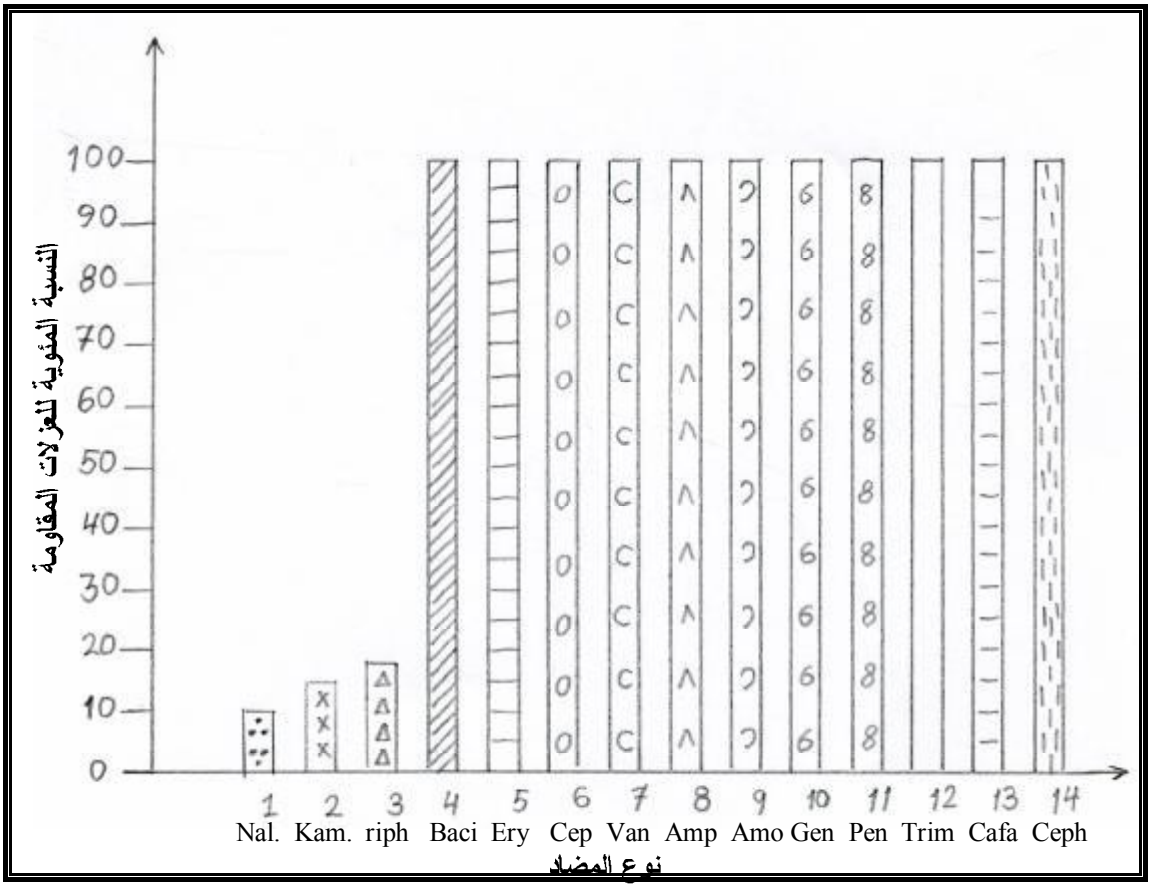
شكل رقم (2) تأثير درجات الحرارة الواطئة على نمو بكتريا E. sakazakii.

اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحياتية Antibiotics

يلاحظ من شكل رقم [3] إن هذه البكتريا كانت مقاومة لأغلب المضادات الحياتية، في حين إنها حساسة لمضادات Nalidixic acid و Kanamycin و riphampin وهذا ما لاحظه [12] من إن هذه البكتريا مقاومة للعديد من مضادات الحياة المستخدمة في العلاج كالبنسلين (Penicillin) والسيفالوسبورين (Cephalosporin) ولكن إضافة (Clavulanic acid) ممكن أن يستخدم للحد من نمو البكتريا. كما ذكر [13] إن هذه لبكتريا حساسة لمضاد (Cefataxime).

ويعود سبب مقاومة هذه البكتريا للمضادات الحياتية إلى احتواءها على بلازميدات Plasmids حاوية على إنزيمات خاصة بهذه المقاومة مثل إنزيم (ESBLs)–extended spectrum beta–lactamases وإنزيم Ampc beta– lactamases والذي يقوم بتثبيط فعالية المضادات [12].

كما لوحظ إن بكتريا E. cloacae تحتوي على إنزيم B–lactamases من نوع NMC–A و 1M 1–1 ويثبط هذان الإنزيمان بواسطة Clavulanic acid [12، 13]. كما ذكرت [12] إن المقاومة لمجموعة مضادات Aminoglycosides تأتي من احتواء البكتريا على إنزيمات aminoglycoside–inactivating enzyme.



شكل رقم (3) النسبة المئوية لعزلات بكتريا E. sakazakii المقاومة.

References

[1] N. R. Mullane, J. Murray, D. Drndy, N. Prentice, P. Whyte, P. G. Wall, A. Parton, and S. Fanning. "Detection of E. sakazakii in Dried infant milk formula by cationic – magnetic – Bead capture" *Appl. Environ. Microbial* Sep. 2006, P. 6325 – 6330

[2] U. S. Food and Drug Administration (FDA). "Isolation and enumeration of E. sakazakii from dehydrated powdered infant formula" July 2002; P : 1 – 6.

[3] W. M. Nazar, Nazarowee–white M., and J. M. farber. "Thermal resistance of E. sakazakii in reconstituted dried – infant formula". *Lett. Appl. Microbiol.* 1997. 24 (1): 9 - 13.

[4] H. B. Kim, Beuchat L.R. "Survival and growth of Enterobacter sakazakii on fresh-cut fruits and vegetables and in un

Abstract

This research was performed to study Enterobacter sakazakii which causes many diseases. The bacteria was isolated from different local foods, and identified when developed yellow pigmented colonies on TSA and oxidase positive.

The bacteria were resistant to high temperature up to 60°c but above this temperature (65°c) the bacteria were killed after 15 min incubation, also the bacteria were resistant to low temperature until –8°c for 24 hr. This bacteria were resistant to most of the antibiotics used in the study except: Nalidixic acid, Kanamycin, and riphampin.

pasteurized Juices as affected by storage temperature". *J. Food prot.* 2005 Dec; 68(12):2541 – 52.

[5] H. Kim, Ryu JH, Beuchat LR. "Survival of E. sakazakii on fresh produce as affected by tempreture and effectiveness of sanitizer for its eliminater." *J. Food microbiol*. 2006 1, 11(2):134 – 143.

[6] R. E. Hawking, Lissner, C. R. and Sanford, J. D. "Enterobacter sakazakii bacteremia in an adult". *J. P.* 1991 84 (6):793 – 795.

[7] J. B. Gurtler and L. R. Beuchat. "Performance of media for recovering stressed cells of Enterobacter sakazakii as determined using spiral plating and Ecometric Techniques". *Appl. Enveron. Microbiol.* 2005 Vol:71 (12) P:7661 – 7669.

[8] A. L. Barry, Garcia, F., and Thrupp, L. D. "An improved single – disk method for testing the antibiotics susceptibility of rapidly growing pathogens". *Am. J. clin.* Path. 1970 53:149–158.

[9] National committee of clinical laboratory standards. "Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests". 1988 7(10).

[10] Mc. Kandhai, Reij MW, grognou C, Van Schothorst M, Gorris LG, Zwietering MH. "Effect of precutturing conditions on lag time and specific growth rate of E. sakazakii in reconstituted powdered infant formula". *Appl. Environ. Microbiol*. 2006 72(4):2721 – 9.

[11] H. B. Kim, beuchat L. R. "Survival and growth of E. sakazakii on fresh – cut fruits and vegetables and in un pasteurized juices as affected by storage temperature". *J. Food* 2005 68(12): 2541-52.

[12] S. l. Fraser "Entrobacter infections". *An Article/medicine* 2007: 1 – 30.

[13] K. D. Sheri, Dennison, MD, Joseph Morris, MD "Multi resistant Enterobacter sakazakii wound infection in an adult". *Infect Med*. 2002 19(11) : 533 – 535.