عزل بكتيريا الأمعائية الساكازاكية من بعض أنواع التوابل

محمد بلال[1] و ابتسام حمد[2] و أيمن المريري[3]

[1] قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة دمشق– سورية.
[2] قسم العلوم البيئية – كلية العلوم – جامعة دمشق– سورية.
[3] قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية ـ هيئة الطاقة الذرية السورية.

تاريخ الإيداع 2010/10/27
قبل للنشر في 2011/07/05

الملخص

تُعد بكتيريا *Enterobacter sakazakii* من العوامل الممرضة الانتهازية المسببة لإصابات مميتـة عند الأطفال وكبار السن والبالغين منقوصي المناعة، وهي بكتيريا عصوية الشكل سالبة الغرام لا هوائية اختيارية تنتمي إلى فصيلة Enterobacteriaceae وجنس *Enterobacter*. ومع أن الموطن الطبيعي لهذه البكتيريا غير محدد بدقة إلا أن وجودها بنسبة كبيرة في التوابل والأعشاب قد يشير إلى أن النباتات تمثل الخازن الطبيعي لها.

تناولت هذه الدراسة مجموعة ضمت 59 عينة من التوابل (المخلوطة وغير المخلوطة)، زرعتْ على أوساط عامة وانتقائية، ثم تم التحري عن وجود بكتيريا الـ *E. sakazakii* بالاعتماد على فعالية أنـزيم الـ α-glucosidase وذلك باستخدام وسط آغار مولد الصبغ *Enterobacter sakazakii* Isolation Agar (ESIA) الحاوي على المـداد 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-α,D-glucopyranoside (XαGlc) الذي تحلمهه هذه البكتيريا مما يؤدي إلى تشكل مستعمرات زرقاء مخضرة، وأُتبع ذلك بإجراء اختبار تأكيدي بزرعها على وسط آغار تريبتون الصويا Tryptone Soy Agar (TSA)، ومـن ثـم عزلت المستعمرات الصفراء النموذجية وحددت هويتها من خلال الاختبارات الحيوية الكيميائية والتفاعـل السلسلي للبوليميراز PCR، وقد أظهرت النتائج أن نحو 50% من العينات المدروسة تحوي بكتيريا *E. sakazakii*.

الكلمات المفتاحية: الأمعائية الساكازاكية، التوابل، الاختبارات الحيويـة الكيميائيـة، التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR.

Isolation of *Enterobacter sakazakii* from Some Spices

M. Belal[(1)]; I. Hamad[(2)] and A. Al-Mariri[(3)]

[(1)] **Department of Plant Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.**

[(2)] **Department of Ecology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.**

[(3)] **Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy commission of Syria.**

Received 27/10/2010

Accepted 05/07/2011

ABSTRACT

***Enterobacter sakazakii* is considered an opportunistic pathogen that has been associated with severe lethal infections especially in neonates, elderly, and Immunocompromised adults. *E. sakazakii* is a Gram negative, facultative anaerobes rod-shaped bacterium. It belongs to the family Enterobacteriaceae and genus *Enterobacter*.**

Although we don't know the natural habitat of this bacteria we find that it exists in high rate in herbs and spices which indicates that plant may be this natural habitat.

Our study focused on spices, and contained 59 specimen (mixed, unmixed), which cultivated on general and selective medium, then we detected its present based on α-glucosidase activity by using ESIA medium that contains 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-α,D-glucopyranoside (XαGlc) as a substrate which the bacteria hydrolyses it then producing blue-green colony, then we confirmed our results by cultivated these colonies on Tryptic Soy Agar (TSA), after this we chose the typical yellow one to identify it by using biochemical tests and Polymerase chain reaction PCR. Our results showed that 50% of the examined specimen contained *E. sakazakii*.

Key words: *Enterobacter sakazakii*, Spices, Biochemical tests, Polymerase chain reaction (PCR).

المقدمة

التوابل هي ثمار أو بذور أو جذور أو خلاصات نباتية مجففة تضيف إلى الأطعمة نكهة خاصة أو تكون مكملة للطبق، ولكثير منها نكهة لاذعة لذلك تضاف بكميات صغيرة نسبياً. وتُستخدم بعض التوابل في أثناء الطهي وقد تُضاف قبل تقديم الطبق.

وقديماً ارتبط استخدام التوابل بالسحر والأغراض الطبية والطقوس الدينية. كما اشتُهر العرب منذ قديم الزمان باستعمال البهارات في الطبخ، فهي تعطي ألواناً طبيعيةً ونكهاتٍ محببة ذات مذاق مميز يساعد على فتح الشهية.

لكل نوع من الأطعمة بهارات خاصة تضفي عليه مذاقاً مميزاً، وتفضل الشعوب العربية البهارات ذات الرائحة الطيبة، أما شعوب شرق آسية فيفضلون البهارات ذات الرائحة القوية والحارة والأعشاب البحرية لما لها من فوائد طبية عديدة. وفي الغرب يقل استخدام البهارات في أطعمتهم ويقتصر على عدد قليل من البهارات في بعض الأطعمة. إلا أن هذه الفوائد الكثيرة للتوابل تترافق مع وجود عدة عوامل ممرضة منها بكتيريا *Enterobacter sakazakii*.

تعد الـ *Enterobacter sakazakii* (التي تُعرف حالياً باسم *Cronobacter* spp.) من العوامل الممرضة الانتهازية، وهي بكتيريا عصوية الشكل مستقيمة، سالبة الغرام، تنتمي إلى فصيلة *Enterobacteriaceae*، أبعادها 3 ميكرون طولاً و1 ميكرون عرضاً، متحركة بواسطة سياط محيطية peritrichous، غير متبوغة، لا هوائية اختيارية، وهي سالبة للأوكسيداز وموجبة للكاتالاز والألفا دي غلوكوزيداز، ترجع النترات إلى نتريت وتستخدم السيترات وتخمر اللاكتوز وتنزع زمرة الكربوكسيل من الأورنيثين ولا تنزعها من الليزين، كما أنها موجبة لاختبار إنتاج الأسيتوئين (Voges-Proskauer test) وسالبة لاختبار أحمر الميتيل، وهي مقاومة بشكل ملحوظ للضغط الحلولي والجفاف ومقاومة للحرارة بدرجة أقل [1, 2, 3].

تنمو هذه البكتيريا بدرجات حرارة تراوح بين 5.5-47°م لكن درجة الحرارة المثلى لنموها تراوح بين 37-43°م، ويراوح زمن الجيل في درجة حرارة 22°م بين 37–44 دقيقة، وفي درجة حرارة 37°م يكون نحو 20 دقيقة [4].

تصيب هذه البكتيريا الفئات العمرية جميعها إلا أن الأطفال الذين لم يكملوا عامهم الأول هم الأكثر عرضةً للخطر المميت ومن بين الرضع يعد الخدج ذوي الأوزان القليلة (≤2.5 كغ) أو غير مكتملي النمو (في أول 28 يوماً بعد الولادة) الأكثر عرضةً للإصابة [5].

تسبب الـ *E. sakazakii* التهاب السحايا Meningitis والتهاب الأمعاء والقولون الناخر Necrotizing enterocolitis عند الأطفال، وتجرثم الدم Bacteremia وإصابات تترافق مع القثطرة عند البالغين منقوصي المناعة، مع نسبة وفيات تراوح بين 10-80% [6, 7].

من بين الحالات جميعها يموت نحو نصف المرضى خلال الأسبوع الأول من الإصابة، ويعاني 94% من الناجين المصابين بالتهاب السحايا من مضاعفات عصبية حادة [10, 9, 8].

وفي عام 1980 ميز Farmer *et al.* هذه البكتيريا كنوع مستقل، وذلك بالاعتماد على الاختلافات في تهجين DNA-DNA والاختبارات الحيوية الكيميائية والحساسية للصادات الحيوية، ويعود سبب التسمية إلى الميكروبيولوجي الياباني Riichi sakazakii [1].

ونظراً إلى كون هذه البكتيريا توجد في أغذية الأطفال ـ بما في ذلك حليب الأطفال المجفف ـ مع نسبة إمراضية ووفيات مرتفعة لدى الرضع لذا فقد اقترح Iversen *et al.* في عام 2008 تسمية هذه البكتيريا بالـ *Cronobacter gen nov.* وذلك نسبةً إلى بطل الأسطورة اليونانية كرونوس حيث تقول الأسطورة بأن كرونوس ـ وهو ابن أورانوس وغايا ـ قام بقتل والده، وخوفاً من أن يقوم أطفاله بقتله كما فعل بوالده من ذي قبل كان يقوم بابتلاعهم [11].

وهكذا أُعيد تصنيف الـ *E. sakazakii* إلى خمسة أنواع في جنس جديد هو *Cronobacter* ضمن فصيلة الـ *Enterobacteriaceae*، وهذه الأنواع هي *C.sakazakii* و*C.turicensis* و*C.malonaticus* و*C.muytjensii* و*C. dublinensis*، ويمكن عد هذه الأنواع جميعها ممرضة إذْ إنّها عزلت من حالات سريرية لإصابات لدى كل من الرضع والبالغين [12].

تنبع أهمية هذا البحث من كونه يرصد وجود هذه البكتيريا في مواد غذائية تُضاف إلى أغلب الأطعمة التي نتناولها يومياً ومن الأعمار كلّها. وقد اختيرت هذه البكتيريا لأنه لم يتم التطرق لها من قبل في القطر؛ لذلك فإن هدف هذه الدراسة هو الحصول على هذه البكتيريا منمطة والحصول على سلالة مرجعية لها لدراسة إمراضيتها فيما بعد، وللحصول على المستضدات النوعية لتشخيصها نظراً إلى خطورة ما تسببه من أمراض لتفادي حصولها في بلادنا.

مواد البحث وطرائقه

المواد:

أوساط الاستنبات والزرع:

ماء البيتون الموقي Buffered Pepton Water (BPW)، مرق لوريل سلفات التريبتوز المعدل مع الفانكومايسين modified Luryl Sulphate Treptose broth/Vancomycin (mLST/Van)، وسط آغار مولد الصبغ أو آغار عزل الأمعائية السلكازلكية *Enterobacter Sakazakii* Isolation Agar (ESIA)، وسط آغار تريبتون الصويا Tryptone Soy Agar (TSA).

مواد عزل الجينوم البكتيري:

الوقاء TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0)، SDS 10%، بروتيناز K 20mg/ml، NaCl 5M، CTAB، كلوروفورم إيزوأميل الكحول (24:1)، فينول كلوروفورم إيزوأميل الكحول (25:24:1)، إيزوبروبانول، إيتانول 70%.

مواد التفاعل السلسلي للبوليميراز والرحلان:

وقاء 10X PCR (200mM Tris-HCl pH8.8, 100mM KCl,100mM $(NH_4)_2SO_4$, 1mg/ml BSA, 1% Triton)، $MgSO_4$، نكليوتيدات (dCTP, dATP, dTTP, dGTP)، أنزيم DNA بوليميراز، بادئات نوعية (الجدول1)، هلامة الآغاروز 1.5% (W/V)، الوقاء 1X TAE المحضر من الوقاء 50X TAE (0.4M Tris-Base, 10mM EDTA pH 8.0, 57.1 ml Glacial Acetic Acid).

مواد الاختبارات الحيوية الكيميائية:

ماء أوكسجيني 3%، سترييات أوكسيداز BBL™DrySlide™ (BD,USA)، KOH، ألفا نفتول، أحمر الميتيل، وسط MR-VP، وسط MacConkey agar.

مادة الحفظ:

غليسيرول 20%.

التوابل المدروسة:

التوابل غير المخلوطة هي: الكاري والكمون والسماق والعصفر والشطة والفلفل الأبيض والفلفل الأسود والكزبرة اليابسة والمحلب والورص والزنجبيل والقرفة والهيل والخولنجان والقرنفل والنعنع والأوريغانو والكراوية والشطة الهندية والحلبة والمردكوش.

التوابل المخلوطة هي: بهارات الكبسة والبرياني والفاهيتا والهمبرغر والفلافل والبريكا والشاورما والكيجن والأوزي والسمك والسلطة والماجي والطاهي والشيش والنقانق والبروستد والجبنة.

الطرائق:

يتضمن زرع بكتيريا *E. sakazakii* عدة مراحل أولها الإغناء الأولي غير الاصطفائي وذلك بأخذ 0.5 غ من العينة وتنميتها في 4.5 مل من ماء البيتون الموقي (BPW) بالدرجة 37°م مدة 18 ساعة، يلي ذلك مرحلة الإغناء الاصطفائي حيث يؤخذ 50 µl من وسط BPW الملقح بالعينة وتنمى في 5 مل من مرق لوريل سلفات التريبتوز المعدل/فانكومايسين (mLST/Vancomycin) بالدرجة 44°م مدة 24 ساعة، وبعدئذٍ يزرع 10 µl من الوسط السابق على الآغار مولد الصبغ (ESIA) بالدرجة 44°م مدة 24 ساعة حيث يحوي هذا الوسط التفريقي على المداد 5-bromo-4-chloro-3-

indolyl-α,D-glucopyranoside الذي تقوم بكتيريا *E. sakazakii* بحلمهته نظراً إلى احتوائها على أنزيم ألفا غلوكوزيداز معطيةً اللون الأزرق المخضر المميز لمستعمرات *E. sakazakii* [13].

يتم التأكد بنقل هذه المستعمرات إلى وسط آغار تريبتون الصويا (TSA) الذي يستعمل لتنمية بكتيريا الأمعائيات عموماً وحضنها بالدرجة 25°م مدة 48-72 ساعة، فتظهر عليه المستعمرات النموذجية لبكتيريا *E. sakazakii* بلون أصفر وبقطر 1-1.5 ملم.

وللحصول على هذه البكتيريا نقيةً تؤخذ مستعمرة مفردة وتزرع على وسط (ESIA) وتكرر هذه العملية حتى نحصل على طبق يحوي مستعمرات نموذجية فقط.

اِنتُفيتْ إحدى هذه المستعمرات النموذجية وأُجريت عليها الاختبارات الحيوية الكيميائية الآتية:

- اختبار الأوكسيداز: أُجري باستعمال سترببات $BBL^{TM}DrySlide^{TM}$ (BD,USA) حيث يوضع عليها جزء من المستعمرة فإذا تغير اللون إلى الأزرق البنفسجي يعد التفاعل إيجابياً، في حين يعد سلبياً إذا لم يتغير اللون.
- اختبار الكاتلاز: أُجري باستعمال الماء الأكسجيني 3%، حيث يوضع هذا الأخير على شرائح زجاجية ثم يوضع فوقها جزء من المستعمرة، يعد التفاعل إيجابياً في حال ظهور فقاعات، ويكون سلبياً في حال عدم ظهورها.
- اختبار الألفا غلوكوزيداز: أُجري باستعمال أطباق تحتوي على وسط ESIA الحاوي على المداد 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-α,D-glucopyranoside، حيث تحلمه البكتيريا هذا الأخير في حال احتوائها على أنزيم ألفا غلوكوزيداز منتجةً اللون الأزرق المخضر المميز.
- اختبار تخمير اللاكتوز: أُجري باستعمال أطباق تحتوي على وسط MacConkey Agar الحاوي على سكر اللاكتوز، إذ تقوم البكتيريا المخمرة للاكتوز بإنتاج مركبات حمضية تخفض الـ pH إلى أقل من 6.8، مما يتسبب بتغير لون الوسط لاحتوائه على مشعر لوني هو الأحمر المعتدلneutral red.
- اختبار أحمر الميتيل والفوكس بروسكاوير: أُجري بتنمية البكتيريا في 3 مل من وسط MR-VP وهو وسط يضم بيبتون ووقاء وغلوكوز أو ديكستروز، ثم حضِن المستَنْبت في درجة حرارة 37°م مدة 24 ساعة، ثم تُقسم العينة إلى قسمين ليتم إجراء اختبار أحمر الميتيل على أحدهما واختبار الفوكس بروسكاوير على الآخر.
- اختبار أحمر الميتيل: أُجري بإضافة بضع قطرات من مشعر أحمر الميتيل إلى المستَنْبت، إذ يدل تغير اللون إلى الأحمر على إيجابية التفاعل (pH الوسط أصغر من 4)، حيث تقوم بعض أنواع البكتيريا بتحويل الغلوكوز أو الديكستروز إلى مركبات

حمضية ثابتة مثل حمض اللبن أو حمض الخل أو حمض النمل؛ وبـذلك تتغلـب هـذه المركبات الحمضية على الموقي، ويصبح الوسط حمضياً، أما تَغَير اللون إلى البرتقالي (pH الوسط يساوي 7) وإلى اللون الأصفر (pH الوسط أكبر من 7) فيدلان علـى أن التفاعل سلبي.

- اختبارالفوكس بروسكاوير: أُجري بإضافة 0.5 مل من الكاشف A (KOH) و0.5 مل من الكاشف B (α-naftol) إلى المستنبت، إذ يدل تغير اللون إلى الأحمر على إيجابية التفاعل، إذْ يكشف هذا الاختبار عن الأحيـاء المنتجـة للأسـيتوئين (أسـيتيل ميثيـل كاربينول) الذي يتأكسد بوجود هيدروكسيد البوتاسيوم إلى دي أسيتيل، الـذي يتفاعـل بدوره منتجاً اللون الأحمر، أما ظهور اللون النحاسي فيدل على سلبية التفاعل.

أُجري تفاعل الـ PCR على المستعمرات الصفراء النموذجية الناميـة علـى وسـط TSA بعد عزل الجينوم البكتيري لها وفق مايأتي:

1. نُميت البكتيريا في ماء البيتون الموقي ثم ثُفِلَت مدة 5 دقائق بسرعة 4000 rpm وفي الدرجة 4°C+ وتم التخلص من السائل الطافي.
2. حل الراسب في 567 µl من الموقي TE بوساطة الميكروبيبت، ثم أُضيف إليه 30 µl من الـ 10% SDS و3 µl من الـ 20 mg/ml proteinase K. مزج المجمـوع وحضِن مدة ساعة بالدرجة 37°م مع الرج بسرعة 1000 rpm.
3. أُضيف 100 µl من الـ 5M NaCl ومزج جيداً ثم أُضيف 80 µl من محلول الـ CTAB/NaCl. مزج المجموع وحضِن مدة 10 دقائق بالدرجـة 65°م مـع الـرج بسرعة 1000 rpm.
4. أُضيف 780 µl من الـ chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ومزج ثم ثُفـل مدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm ونُقِل الطافي إلى أنبوب جديد مع تجنب سحب أي جزء من الطبقة الوسطى البروتينية.
5. أُضيف إلى الطافي حجم مماثل من الـ phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) ومزج ثم ثُفل مدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm، ونُقِل الطـافي بعـدها إلى أنبوب جديد مع تجنب سحب أي جزء من الطبقة الوسطى البروتينية.
6. أُضيف إلى الطافي النهائي كمية من الإيزوبروبانول تعادل 0.6 مل من حجمه، ومزج بلطف بقلب الأنبوب 4-6 مرات حتى يترسب الدنا DNA حيث يظهر بشكل خيـوط سابحة في السائل، ثم ثُفل مدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm، ثم تم الـتخلص مـن الإيزوبروبانول بلطف لتجنب رمي الدنا DNA.
7. غُسِل الراسب بإضافة 1 مل من الإيتانول 70%، ثم ثُفل مدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm ورمِي الطافي وجفف الراسب بوساطة جهـاز الـ Concentrator (شـركة eppendorf).

8. حل الراسب الناتج في 25 µl من الموقي TE ثم قِيس تركيزه بوساطة جهاز المطيافية (Nano Drop) ومدد للوصول إلى تركيز يساوي 100 ng/µl.

أُجري التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR على الدنا DNA المعزول من المستعمرات الصفراء النموذجية النامية على وسط TSA باستخدام البادئات النوعية الموضحة في الجدول (1).

الجدول (1) البادئات النوعية المستخدمة في البحث.

Primer	Sequence (5´to 3´)	عدد الأسس	Size (bp)
SI-F	5´-CAG-GAG-TTG-AAG-AGG-TTT-AAC-T-3´	22	251 bp
SI-R	5´-GTG-CTG-CGA-GTT-TGA-GAG-ACT-C-3´	22	
SG-F	5´-GGG-TTG-TCT-GCG-AAA-GCG-AA-3´	20	282 bp
SG-R	5´-GTC-TTC-GTG-CTG-CGA-GTT-TG-3´	20	
EsAg-F	5´-TGA-AAG-CAA-TCG-ACA-AGA-AG-3´	20	1680 bp
EsAg-R	5´-ACT-CAT-TAC-CCC-TCC-TGA-TG-3´	20	

أُجري التفاعل بحجم 25 µl، ويوضح الجدول (2) المواد المستخدمة في التفاعل، في حين يوضح الجدول (3) الشروط اللازمة لحدوث هذا التفاعل.

الجدول (2) المواد المستخدمة في تفاعل PCR.

Materials	Final conc. µl	25 µl PCR
Genomic DNA	200-500 ng	2 µl DNA (100ng)
Primer 1 -10 µM	20 µM	2 µl
Primer 2-10 µM	20 µM	
dNTPs 20 mM	0.4 mM	0.5 µl
Buffer 10X	1X	2.5 µl
$MgSO_4$ 50 mM	3 mM	1.5 µl
Taq 5U	2 U	0.2 µl
H_2O	----	16.3 µl

الجدول (3) شروط تفاعل PCR.

		Temperature	Time
	Initial denaturation	C°95	5 mins
35 Cycle	**Denaturation**	C°95	1 min
	Annealing	C°57	1 min
	Extension	C°72	1.5 min
	Final Extension	C°72	10 mins

ومن ثم كُشفَ عن نواتج الـ PCR باستخدام هلامة الآغاروز 1.5% (W/V) المحضرة في الوقاء 1X TAE والترحيل على فولطية 70V مدة ساعة واحدة.

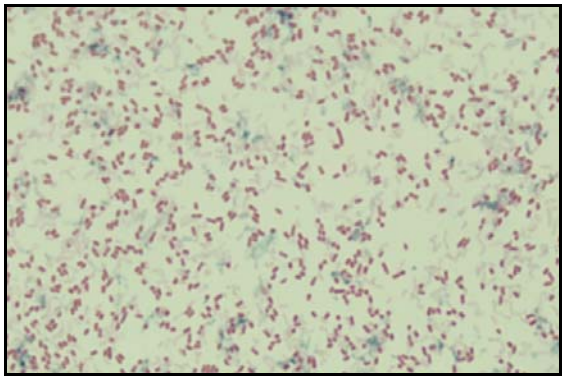
احتُفظَ بالمستعمرات المؤكدة في الـ BPW مع الغليسيرول 20%، ومن ثم حفظت بحرارة -80°م من أجل الدراسات اللاحقة.

النتائج والمناقشة

ظهرت مستعمرات *E. sakazakii* على وسط ESIA بلون أزرق مخضر، وهنا يلاحظ وجود نمطين من المستعمرات مختلفين من الناحية الشكلية حيث يظهر النمط الأول بشكل مستعمرات جافة أو مخاطية ذات حافات مشرشرة، وقد تكون شبه لزجة لدى لمسها بإبرة الزرع، في حين يظهر النمط الثاني بشكل مستعمرات ملساء نموذجية غير منفصلة.

وبعد التأكد من المستعمرات بنقلها إلى وسط آغار ترايبتون الصويا (مستعمرات صفراء نموذجية) انتُقيت مستعمرات مفردة لإجراء الفحص المجهري لها والاختبارات الحيوية الكيميائية واختبار PCR.

لوحظ لدى تلوين المستعمرات الصفراء النموذجية المأخوذة من وسط TSA أن هذه البكتيريا عصوية الشكل، قصيرة، سالبة لصبغة الغرام، ويوضح الشكل (1) الشكل المجهري لهذه البكتيريا بتكبير 100X.



الشكل (1) الشكل المجهري لبكتيريا *E. sakazakii* بتكبير 100X

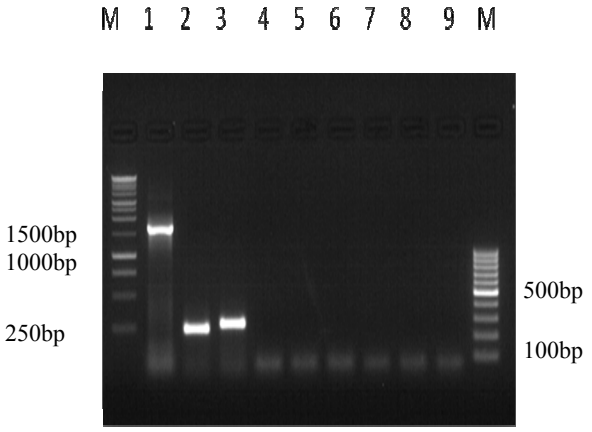
كانت عزلات *E. sakazakii* جميعها موجبة للكاتلاز، سالبة للأوكسيداز، موجبة لاختبار الألفا غلوكوزيداز، مخمرة للاكتوز، سالبة لاختبار أحمر الميتيل، وموجبة لاختبار الفوكس بروسكاوير، وهذا يتوافق مع نتائج الدراسات العالمية حول هذه البكتيريا[3,2,1]. ويوضح الجدول (4) نتائج الاختبارات الحيوية الكيميائية للعينات الإيجابية، وذلك حسب نتائج الـ PCR.

راوحت الحمولة البكتيرية للـ *E. sakazakii* في عينـات التوابـل الإيجابيـة بـين 10^3X1 ـ $10^4X3.5$ خلية بكتيرية/1غ، في حين راوحت الحمولة البكتيرية الكلية بـين $10^4X2.8$ ـ $10^4X8.8$ خلية بكتيرية/1غ وقد يعود ذلك إلى قدرة هذه البكتيريـا علـى تحمل ظروف الجفاف.

أُجري PCR على المستعمرات النموذجية باستعمال البادئات الـسابقة وأُدخـل فـي التفاعل شاهد سلبي مع كل البادئات فضلاً عن عينات دون دنا DNA، ونتيجة التفاعـل موضحة في الشكل (2).

الجدول (4) نتائج الاختبارات الحيوية الكيميائية للعينات الإيجابية.

	أوكسيداز	كاتلاز	ألفا غلوكوزيداز	تخمير اللاكتوز	أحمر الميتيل	فوكس بروسكاوير	PCR		
							SI	SG	EsAg
كاري	-	+	+	+	-	+	+	+	+
كزبرة يابسة	-	+	+	+	-	+	+	+	+
بهارات نقانق	-	+	+	+	-	+	+	+	+
بهارات بروستد	-	+	+	+	-	+	+	+	+
بهارات شاورما	-	+	+	+	-	+	+	+	+
بهارات حبنة	-	+	+	+	-	+	+	+	+
بهارات شيش	-	+	+	+	-	+	+	+	+
فلفل أبيض	-	+	+	+	-	+	+	+	+
ماجي	-	+	+	+	-	+	+	+	+
بهارات كبسة	-	+	+	+	-	+	+	+	+
بهارات ساطة	-	+	+	+	-	+	+	+	+
بهارات أوزي	-	+	+	+	-	+	+	+	+
بهارات فلافل	-	+	+	+	-	+	+	+	+
بهارات طاهي	-	+	+	+	-	+	+	+	+
جوزة الطيب	-	+	+	+	-	+	+	+	+
كركم	-	+	+	+	-	+	+	+	+
سماق	-	+	+	+	-	+	+	+	+
كمون	-	+	+	+	-	+	+	+	+
شوفان	-	+	+	+	-	+	+	+	+
خولنجان	-	+	+	+	-	+	+	+	+
بذر كتان	-	+	+	+	-	+	+	+	+
مردكوش	-	+	+	+	-	+	+	+	+
نعنع	-	+	+	+	-	+	+	+	+
بذر خلة	-	+	+	+	-	+	+	+	+
إكليل الجبل	-	+	+	+	-	+	+	+	+
ببريكا	-	+	+	+	-	+	+	+	+
شطة هندية	-	+	+	+	-	+	+	+	+
قرفة	-	+	+	+	-	+	+	+	+
سماق	-	+	+	+	-	+	+	+	+



M. واسم جزيئي
1. عينة *E. sakazakii* مع البادئة EsAg
2. عينة *E. sakazakii* مع البادئة SI
3. عينة *E. sakazakii* مع البادئة SG
4. عينة *Brucella* مع البادئة EsAg
5. عينة *Brucella* مع البادئة SI
6. عينة *Brucella* مع البادئة SG
7. عينة دون DNA مع البادئة EsAg
8. عينة دون DNA مع البادئة SI
9. عينة دون DNA مع البادئة SG

الشكل (2) ناتج التفاعل السلسلي للبوليميراز على هلامة الآغاروز 1.5% (W/V)

يلاحظ في الشكل ظهور عصابات بـأطوال 1680 bp و251 bp و282 bp وهـذا يوافق البادئات النوعية EsAg وSI وSG على التوالي، حيث صممت البادئة EsAg من مورثة الألفاغلوكوزيداز *gluA* [14] في حين صممت البادئتان SI وSG من المـسافات المنتسخة البينية ITS للـ 16S والـ 23S للـ rDNA [15]. كما يلاحظ عدم ظهـور أي عصابات موافقة للبادئات السابقة لدى استخدام بكتيريا أخرى سالبة الغـرام أو لـدى إجراء التفاعل دون وجود بكتيريا؛ الأمر الذي يدلّ على نوعية هـذه البادئـات لبكتيريـا *E. sakazkaii*.

ويوضح الجدول (5) النسب المئوية لوجود هذه البكتيريا في العينات المدروسـة بعـد التأكد منها بالطرائق السابقة.

الجدول (5) النسب المئوية لبكتيريا *E. sakazakii* المعزولة من التوابل.

المادة الغذائية	عدد العينات	عدد عزلات *E. sakazakii*	النسبة المئوية
التوابل غير المخلوطة	33	18	55%
التوابل المخلوطة	26	11	42%
المجموع الكلي	59	29	49%

يمكن لبكتيريا *E. sakazkaii* أن توجد في البيئة والأطعمة، وقـد يكـون المـوطن الطبيعي لها هو إحدى المواد النباتية وهذا هو سبب عزلها من الأعشاب الجافة والتوابـل، وقد تؤدي المواد المشكلة للمحفظة والفيلم الحيوي التي تنتجها هذه البكتيريا دوراً في بقائها حية في البيئات الجافة وفي تقديم الحماية لها من الأشعة فوق البنفسجية والضغط الحلولي المرتفع والحموض والعوامل المثبطة كالمنظفات والمطهرات والصادات الحيوية والبالعات والأضداد وملتهمات البكتيريا.

قد يحدث تلوث النباتات بهذه البكتيريا عن طريق الاستيطان الداخلي أو عـن طريـق التماس مع الماء أو التربة الحاوية على هذه البكتيريا أو العوامل الحيـة كالحـشرات أو الفقاريات الصغيرة؛ وهذا بدوره يؤدي إلى تلوث الأطعمة الخام ذات المصادر الحيوانيـة التي تنقل التلوث بدورها عن طريق لحومها أو برازها إذ يؤدي التعامل مع هذه اللحـوم في أثناء تحضير الأطعمة إلى حدوث العدوى في حال عدم اتخاذ التدابير الوقائية اللازمة والطهي الجيد للأطعمة [16].

ولما كان من الصعوبة بمكـان الاعتمـاد علـى طريقـة واحـدة لتمييـز بكتيريـا الـ *E. sakazakii*، فقد اعتمدت هذه الدراسة على استخدام تقانات لونية وحيوية كيميائية وجزيئية مثل التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR وذلك باستخدام 3 أزواج مـن البادئـات النوعية.

تشير بعض الدراسات إلى عدم كفاية الاختبارات الحيوية الكيميائية أو اللونية بمفردها كأداة تشخيصية لتحديد هوية هذه البكتيريا، بل لا بد من اللجوء إلـى بعـض الطرائـق الجزيئية بما فيها التفاعل السلسلي للبوليميراز وسلسلة الـ DNA [19,18,17]، ومن هنا تأتي أهمية هذه الدراسة فضلاً عن كونها الأولى في سورية.

تبين أن 29 عينة توابل من أصل 59 عينة (أي بنسبة 49%) احتـوت علـى هـذه البكتيريا مما يؤكد أن العزلات الرئيسية لهذه البكتيريا وجدت في مصادر نباتية بخـلاف ماتشير إليه معظم الدراسات العالمية وهو أن مصدر هذه البكتيريا هو الأغذيـة الخاصـة بالأطفال والرضع بما في ذلك حليب الأطفال المجفف، ويشير ذلك إلى أن النباتـات قـد تمثل الخازن الرئيسي لهذا العامل الممرض. وتتطابق هذه النتائج مع ما ذكره كـل مـن Forsythe [20] وFriedemann [16].

ومن المؤكد أن قدرة هذه البكتيريا على البقاء في الأطعمة المجففة تعود إلى قـدرتها على تحمل درجات الحرارة العالية وظروف الجفاف، وبذلك فإن نتـائج هـذه الدراسـة تتوافق مع الدراسات التي تشير إلى أن هذه البكتيريا موجودة بشكل واسع فـي الأطعمـة ولاسيما الأعشاب المجففة والتوابل بسبب قدرتها على تحمل الجفاف والدرجات المرتفعـة من الحرارة [21]، وتحمل تبدلات الضغط الحلولي [22].

الاستنتاجات

أخيراً نستنتج أن *E. sakazakii* منتشرة انتشاراً واسعاً في عينات التوابل المدروسة، لذا فقد تعد هذه التوابل أحد المخازن الطبيعية المحتملة لها ومن ثم يجب علينا اتخاذ حيطة خاصة لدى تحضير أغذية الأطفال أو الشيوخ أو المرضى منقوصي المناعة بهدف تجنب التلوث من هذه المصادر. إذْ يمكن لهذه البكتيريا الانتقال من التوابل إلى أطعمة أخرى أو أدوات المطبخ، كما أن ترك الأطعمة بدرجات حرارة غير مناسبة مدداً زمنية طويلة قـد تسهم في تضاعفها بأعداد كبيرة مسببة الإمراضية.

REFERENCES المراجع

1. **Farmer J. J., III, Asbury M. A., Hickman F. W., Brenner D. J. (1980). The Enterobacteriaceae Study Group (USA): *Enterobacter sakazakii*: a new species of "*Enterobacteriaceae*" isolated from clinical specimens. Int. J. Syst. Bacteriol. 30:569-584.**
2. **Iversen C., Waddington M., On S. L., Forsythe S. (2004). Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* species. J. *Clin. Microbiol.* 42:5368-5370.**
3. **Iversen C., Waddington M., Farmer J. J. III, Forsythe S. (2006). The biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes. BMC Microbiol. 6:94.**
4. **Dauga C., Breeuwer P. (2008a). Taxonomy and physiology of *Enterobacter sakazakii*. Ed. By Farber J. M. and Forsyth S. J. ASM press. Washington, D. C. pp 15-16.**
5. **M. Leclerc. (2006). *Enterobacter sakazakii.* Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.**
6. **Corti G., Panunzi I., Losco M., Buzzi R. (2007). Post-surgical osteomyelitis caused by *Enterobacter sakazakii* in a healthy young man. J. Chemotherapy, 19:94-94.**
7. **Muytjens H. L., Zanen H. C., Sonderkamp H. J., Kollee L. A., Wachsmuth I. K., Farmer J. J. (1983). Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. J. Clin. Microbiol., 18:115-120.**
8. **Gallagher P. G. (1990). *Enterobacter* bacteremia in pediatric patients. Rev. Infect. Dis., 12:808-812.**
9. **Lehner A., Stephan R. (2004). Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. J. Food Prot. 67:2850-2857**
10. **Gurtler J. B., Kornacki J. L., Beuchat L. (2005). *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. Int. J. Food Microbiol., 104:1-34.**
11. **Graves R., (Ed). (1992). The Dethronement of Cronos. In *The Greek Myths.* Combined Edition. London: Penguin Books;:39-44.**
12. **Iversen C., Mullane N., McCardell B., Tall B. D., Lehner A., Fanning S., Stephan R., Joosten H. (2008). *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *C. malonaticus* sp. nov., *C. turicensis*, sp. nov., *C. muytjensii* sp. nov., *C. dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies. *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *dublinensis* subsp. nov. *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lausannensis* subsp. nov., and *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lactaridi* subsp. nov. Int. J. Sys. Evol. Microbiol. 58:1442-1447.**
13. **ISO/TS 22964 (2006). Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*. International Organization for Standardization.**

14. **Lehner A., Riedel K., Rattei T., Ruepp A., Frishman D., Breeuwer P., Diep B., Eberl L., Stephan R. (2006). Molecular characterization of the *α*-glucosidase activity in *Enterobacter sakazakii* reveals the presence of a putative gene cluster for palatinose metabolism. Syst. Appl. Microbiol.; 29:609–625.**
15. **Liu Y., Gao Q., Zhang X., Hou Y., Yang J., Huang X. (2006). PCR and oligonucleotide array for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. Mol. Cell Prob. 20:11–17.**
16. **Friedemann M. (2007). *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). Int. J. Food Microbiol. 116:1-10.**
17. **Iversen C., Lehner A., Mullane N., Marugg J., Fanning S., Stephan R., Joosten H. (2007). Identification of "*Cronobacter*" spp. (*Enterobacter sakazakii*). J. Clin. Microbiol., 45:3814-3816.**
18. **Drudy D., Rourke M.O., Murphy M., Mullane N.R., O'Maony R., Kelly L., Fisher M., Sanjaq S., Shannon P., Wall P., O'Mahony M., Whyte P., Fanning S. (2006). Characterization of a collection of *Enterobacter sakazakii* isolates from environmental and food sources. Int. J. Food Microbiol., 110:127-134.**
19. **Fanjat N., Leclercq A., Joosten H., Robichon D. (2007). Comparison of the Phenotyping Methods ID32 and VITEK 2 Compact GN with 16S rDNA Gene Sequencing for the Identification of *Enterobacter sakazakii*. J. Clin. Microbiol., 45:2048-2050.**
20. **Forsythe S. J. (2005). *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infant milk formula. J. Matern Child Nutr., 1:44-50.**
21. **Nazarowec-White M., Farber J. M. (1997). Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. Lett. Appl. Microbiol., 95:967-973.**
22. **Breeuwer P., Lardeau A., Peterz M., Joosten H. M. (2003). Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. J. Appl. Microbiol., 95:967-973.**