الكشف عن قدرة بكتريا *Enterobacter sakazakii* المعزولة من الحليب المجفف لإنتاج السموم المعوية

أ.د. أديبة يونس شريف
م. نجلاء عبد الله فتحي
قسم علوم الحياة
كلية العلوم
م. حنان سامي نوري
فرع العلوم التمريضية الأساسية
كلية التمريض
جامعة الموصل

تاريخ تسليم البحث: ٢٠١١/١٢/٢٧ ؛ تاريخ قبول النشر: ٢٠١٢/٦/٧

ملخص البحث:

تضمنت الدراسة عزل الجراثيم الملوثة لحليب الأطفال المجفف ومن نوعيات مختلفة شملت (ديالاك 2,1 ، Celia -1- ، hery -2-1- ، Biomil -2-1- ، البديع -2- ، نيدو -2-، كيكوز -2- ، نكتاليا -1-2- ، سريلاك) ، أظهرت النتائج عزل (10) عزلات مختلفة من الجراثيم وبنسبة 28.57% توزعت بين 8.57% لـ *Escherichia coli* وبنسبة 5.71% لكل من *Enterobacter sakazakii* و *Klebsiella pneumoniae* على التوالي . في حين كانت نسبة العزل لكل من *Aeromonas veronii* و *Aeromonas hydrophilia* و *Shigella desentri* 2.85% لكل منها على التوالي.

تم التحري عن إنتاج الذيفانات المعوية لجرثومة *Enterobacter sakazakii* في كل من Cell Free Culture Supernatant (CFCS) والـ Lysate Super natant (LS) وباستخدام اختباري تجريح الفئران الرضيعة (Suckling mouse test) والذي أعطى نتيجة موجبة لاختبار النفاذية السريع المتأخر لجلد الأرنب بظهور مناطق زرقاء غير متقرنة للكشف عن الذيفانات الثابت حرارياً Rapid & Delayed permeability test واختبار تورم اكف الفئران (Paw Oedema test) للكشف عن الذيفان المعوي التالف بالحرارة والذي أعطى نتيجة موجبة بتورم في اكف الفئران الأمامية والخلفية مقارنة بالسيطرة.

Detection of the ability of isolated *Enterobacter sakazakii* from powdered milk for enterotoxins production

Prof. Adeeba Y. Shareef **Lect. Najlaa A. Fathi** **Lect. Hanan S. Noori**
Department of Biology **Dept. of Basic Science**
College of Science **College of Nursing**
Mosul University

Abstract:

This study includes isolation & identification of bacteria from (35) different kinds of powdered infant formula milk involoved (Dialak 1-2, Celia 1, Hery 1-2, Biomil 1-2, Albadees 2, Nido 2, Kikose 2, Nictalia 1-2, Cerilak). The results show (10) different isolates of germs at apercentage of 28.57% distributed as 8.57% for *Escherichia coli* & 5.71% for each *Enterobacter sakazakii* and also for *Klebsiella pneumoniae* reguensee, while the isolates of *Aeromonas veronii, Aeromonas hydrophilia, Shigella desentri* was 2.85% for each one of them.

We detected toxins of *Enterobacter sakazakii* in eather cell free culture supernatant (CFCS) and also in lysate supernatant (LS) by used suckling mouse test which gives apositive result for Rapid & Delayed permeability test by appear non keratinize blue aerea on Rabbit skin for detection of Heat -Stable Enterotoxin and also used pow Oedema test for detection of Heat-Labile Enterotoxin for *Enterobacter sakazakii* which gives apositive result by appear biymp in anterior and posterior hand of mouse compired with the control.

المقدمة:

يعد تلوث حليب الأطفال المجفف بالبكتريا السالبة لصبغة كرام خطراً كبيراً يهدد حياة الأطفال حديثي الولادة والرضع وتعد مشكلة كبيرة تلقى اهتماماً في السنوات الأخيرة، تعد *Enterobacter sakazakii* المسببة لتلوث حليب الأطفال نوعا من أنواع البكتريا العائدة إلى العائلة المعوية Enterobacteriaceae سميت سابقاً Cronobacter spp. تتواجد في الجهاز الهضمي للإنسان والحيوان وكذلك في البيئة ، وتصنف بأنها تعود إلى مجموعة Proteobacteria، Gamma Proteobacteria، رتبة Enterobacterials عائلة Enterobacteriaceae جنس Enterobacter نوع Sakazakii (Forsythe and Iversen, 2008). وهي بكتريا عصوية، متحركة لامتلاكها اسواط محيطية (Peritrichous)، تنمو في درجات حرارة تتراوح بين ٥,٥ -٤٧مْ وتسبب المرض للأطفال من (٦ -١٢) شهرا فضلا عن الخدج وحديثي الولادة ونادراً لدى البالغين (Simmons *et al*., 2006; Baroz *et al*., 2009) .

على الرغم من التردد المنخفض للإصابة بالمرض إلا انه في السنوات الأخيرة ازدادت نسبة الإصابة بها في البلدان النامية عن الدول الصناعية وبنسبة (٤٠ -٨٠%) (Hoekstra *et al*., 2007)، وتعد منتجات الحليب والألبان والحليب المجفف من أكثر مصادر العدوى بهذه البكتريا، وقد تم الكشف عنها في أنواع أخرى من الأغذية كالجبن الأبيض واللبن ولكن الصيغة الوحيدة لتفشي المرض في الأطفال الرضع هي الحليب المجفف (Kandhaie *et al*., 2009)، وان وجودها في حليب الأطفال المجفف وأثاره المحتملة في الرضع وحديثي الولادة يشكل مشكلة مهمة من مشاكل الصحة العامة في معظم البلدان وخصوصاً النامية منها وتحدث غالبية الإصابات بهذه البكتريا في مستشفيات الولادة ووحدات العناية المركزية (Townsend *et al*., 2008) .

تتكاثر *Enterobacter sakazakii* بسرعة في الحليب المجفف عند أو فوق درجة حرارة الغرفة لذلك فمن المستحسن ان لا يبقى الحليب المجفف أو السائل في الغرفة أكثر من (٤ ساعات)، وقد أكدت منظمة الأغذية والزراعة الدولية (FAO) ومنظمة الصحة العالمية (WHO) في سنة 2008 ان *Enterobacter sakazakii* تمتلك عوامل ضراوة وامراضية تمكنها من إحداث الإصابة مثل إنتاج بعض السموم المعوية (Enterotoxins) (FAO/ WHO, 2008) ، وقد تم الكشف عن هذه الذيفانات باستخدام المزارع النسيجية إذ أنتجت بعض السلالات تأثيرات سامة على الفئران بإحداث إصابة ، وتعد سلالتين من سلالات *Enterobacter sakazakii* (من أصل ١٨ عينة) قادرة على التسبب في حدوث حالات وفاة الفئران التي يتم تجريعها عن طريق الفم بالحليب الملوث بهذه البكتريا ولذلك يبدو ان هناك اختلافات في الضراوة بين سلالاتها (Richardson and Smith, 2009) .

المواد وطرائق العمل

جمع العينات Samples

جمعت (35) عينة من حليب الأطفال المجفف ومن نوعيات مختلفة شملت (Dialac 1,2 ; Celia 1; Lery 1,2; Biomil 1,2; Al-Badee 2; Nido 2; Kikose 1,2; Naktalia 1; Cerilac 1) ، وان علب الحليب المستخدم في التجربة قسم منها فتحت أثناء إجراء البحث والقسم الآخر مضى على فتحها (3) أيام وكما موضح في الجدول (1) .

جدول (1) : أنواع الحليب المنتخبة مع أنواع الجراثيم المعزولة من علب الحليب المختلفة

نوعية الحليب	العدد	العلب المفتوحة مسبقاً قبل اخذ العينة بـــ(٣) أيام (١٦) علبة	العلب غير المفتوحة (الجديدة) فتحت وقت إجراء التجربة (١٩) علبة	أنواع الجراثيم المعزولة من عينات الحليب المختلفة
Nido 2	1	قديمة		*Escherichia coli*
	1		جديدة	-ve
Dialac 2	2	قديمة		*Escherichia coli* *Aeromonas veronii*
	2	قديمة		-ve
	2		جديدة	-ve
Dialac 1	2	قديمة		*Klebsiella pneumoniae* *Shigella desentri*
	1	قديمة		-ve
	2		جديدة	-ve
Lery 1	1	قديمة		-ve
	1		جديدة	*Enterobacter sakazakii*
Lery 2	1	قديمة		-ve
	1		جديدة	-ve
Celia 1	1	قديمة		*Escherichia coli*
	2		جديدة	-ve
Biomil 1	2		جديدة	-ve
Biomil 2	1	قديمة		*Aeromonas hydrophilia*
	1		جديدة	-ve
Al-Badee 2	1	قديمة		*Enterobacter sakazakii*
Kikose 1	1		جديدة	-ve
Kikose 2	1	قديمة		-ve
	2		جديدة	-ve
Naktalia 1	1	قديمة		-ve
	2		جديدة	-ve
Cerilac 1	1	قديمة		*Klebsiella pneumoniae*
	2		جديدة	-ve

طريقة العمل

تم تخفيف عينات الحليب بالماء المقطر المعقم بنسبة ٥ غم /١٠ مل ولقحت على أوساط MacConkey agar ووسط Blood agar ، حضنت الأطباق عند درجة حرارة (37مْ) ولمدة (24) ساعة ، شخصت العينات أوليا بملاحظة الصفات المزرعية للمستعمرات النامية من ناحية حجم المستعمرة وارتفاعها وشكل حافاتها ولونها وحضرت مسحات رقيقة منها وصبغت بصبغة كرام ولوحظت أشكال الخلايا وترتيبها وقابليتها للاصطباغ بهذه الصبغة ، كما أجريت الاختبارات الكيموحيوية كاختبار فعالية Catalase test ومجموعة اختبارات IMViC و Motility test واختبار فعالية أنزيم Cytochrome Oxidase وUrease test وStarch hydrolysis ونموها على وسط Triple Sugar Iron Agar (TSI) ونموها على وسط Mannitol salt agar (Koneman's *et al*., 2006) .

تم انتخاب البكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز Lactose Fermenting bacteria والمنتجة للحامض، والتي أظهرت نتائج موجبة للتشخيص لبكتريا *Enterobacter sakazakii* ولقحت على وسط (Slant Nutrient Agar) وحفظت بدرجة حرارة (4)مْ في الثلاجة.

دراسة قدرة البكتريا على إنتاج السموم المعوية

أ-١- تحضير المعلق الجرثومي

تم تلقيح (25)سم٣ من وسط (Brain Heart infusion agar) المعقم بالموصدة والموزع في دوارق زجاجية معقمة سعة (100)سم٣ بـ (١)سم٣ من بكتريا *Enterobacter sakazakii* (عزلة واحدة) وحضنت بدرجة حرارة (37)مْ لمدة (18) ساعة في حاضنة هزازة بسرعة (180xg) .

٢- تحضير راشح المزارع الجرثومية الخالي من الخلايا

Cell Free Culture Supernatant (CFCS)

رسبت الخلايا الجرثومية من المعلق الجرثومي الذي حضر كما في الفقرة (١) وباستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد الفوقي عند سرعة (10000xg) لمدة نصف ساعة وبدرجة حرارة (4)مْ ومن نوع (MSE) انكليزي الصنع ، اخذ الرائق وتم ترشيحه خلال مرشحات غشائية بقطر (0.22) Millipore أطلق عليه راشح المستعمرات الجرثومية الخالي من الخلايا والذي رمز له CFCS (Raghav *et al*., 2007; Rahman *et al*., 1992) .

٣ـ تحضير رائق الخلايا المتكسرة

Lysate Super natant (LS)

اخذ الراسب الذي تم الحصول عليه في الفقرة السابقة (أ-٢) وعلق في 5سم٣ من محلول Phosphate buffer بتركيز (0.02M) مولار ورقم هيدروجيني (7.4) (Plummer, 1978) .

حطمت الخلايا البكتيرية باستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية Ultrasonic من نوع (MSE No. P6 1545) بتسليط (20000) ذبذبة /ثانية لمدة 30 ثانية كررت هذه العملية ثلاث مرات مع فترات توقف لمدة 30 ثانية بعد كل مرة لتبريد المحلول وللحفاظ على درجة حرارة (4مْ) في حمام ثلجي . فصل الرائق عن الراسب باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد الفوقي بسرعة (10000xg) ولمدة نصف ساعة رشح الرائق خلال مرشحات غشائية (0.22Mm) وضع الرائق الذي أطلق عليه رائق الخلايا المتكسرة والذي رمز له بـ (LS) في التبريد لحين استخدامه (Hostacka *et al*., 1993) .

بـ ١ـ التحري عن الذيفانات المعوية لجرثومة *Enterobacter sakazakii* :

Detection of Entertoxin for *Enterobacter sakazakii*:

تم التحري عن الذيفان المعوية لجرثومة *Enterobacter sakazakii* بنوعيها الثابت حرارياً الذي تم التحري عنه باستخدام اختبار النفاذية السريع لجلد الأرنب ، والذيفان التالف بالحرارة باستخدام تورم اكف الفئران واختبار النفاذية المتأخرة لجلد الأرنب .

٢ـ اختبار النفاذية السريع والمتأخر لجلد الأرنب :

Rapid & Delayed permeability test of Rabbit skin

استخدمت أرانب بيض بالغة نوع Albino وزنها (1.5-2) كغم إذ تم حقن 0.1 سم٣ من كل من راشح المستعمرات الجرثومية الخالي من الخلايا والذي رمز له بـ CFCS ورائق الخلايا المتكسرة والذي رمز له بـ LS تحت الجلد في منطقة الظهر بعد إزالة الشعر من المنطقة وتعقيمها بالكحول . وبعد ساعة من الحقن تم حقن 0.8 سم٣ من صبغة Evan blue بتركيز (5%) بالوريد . وبعد اقل من (15) دقيقة ظهرت النتيجة الموجبة بشكل مناطق دائرية زرقاء اللون تراوح قطرها (4 ملم) بالنسبة لعامل النفاذية السريع ، الذي يعد اختبارا للذيفان المعوي الثابت حرارياً ، إما بالنسبة لعامل النفاذية المتأخر فظهرت النتيجة الموجبة بعد (48) ساعة بشكل مناطق متقرنة زرقاء اللون ويعد هذا الاختبار كشفا عن الذيفان المعوي التالف بالحرارة (Pagotto *et al*., 2008; Sandefur & Peterson, 1976) .

٣ـ التحري عن الذيفان التالف بالحرارة لجرثومة *Enterobacter sakazakii*
Heat labile Enterotoxin of *Enterobacter sakazakii*

اختبار تورم اكف الفئران (Paw oedema test)

اعتمدت طريقة الباحثين (Harne *et al*., 1990) والتي تتضمن حقن اكف الفئران الأمامية والخلفية بـ(0.1)سم٣ من CFCS وتم قياس سمكها بالفرنيا (Vernier caliper) قبل الحقن . كما اخذ القياس بعد الحقن بأوقات مختلفة متدرجة من (صفر – 12 – 24 – 36 – 48 – 72 – 96) ساعة ونظراً لاختلاف السمك بين الأطراف الأمامية والخلفية التي حقنت النموذج نفسه فقد تم احتساب النسبة المئوية للسمك النسبي بدلاً من الزيادة في السمك الكلي كقياس للسمية Relative thickness (RT%)

$$\text{السمك النسبي \%} = \frac{\text{معدل السمك لأكف الفئران في أوقات مختلفة بعد الحقن}}{\text{معدل السمك لأكف الفئران قبل الحقن}}$$

كما حقن مرق نقيع القلب والدماغ المعقم كسيطرة للمقارنة .

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج العزل (10) عزلات مختلفة من الجراثيم من مجموع (35) عينة من حليب الأطفال بمختلف أنواعه ، وكانت نسبة العزل (28.58%) كعينات ذات مزارع موجبة توزعت بين (8.57%) لـ *Escherichia coli* وبنسبة (5.71%) لكل من *Enterobacter sakazakii* و *Klebsiella pneumoniae* على التوالي في حين كانت نسبة العزل لكل من *Aeromonas veronii* و *Aeromonas hydrophilia* و *Shigella dysentria* (2.85%) على التوالي وكما مبين في الجدول (3,2) .

جدول (2) النسب المئوية للجراثيم المعزولة من عينات الحليب المختلفة (القديمة والجديدة)

أنواع الحليب التي عزلت من الجراثيم المختلفة	علب الحليب التي فتحت قبل (٣) أيام من اخذ العينة (١٦) علبة			علب الحليب التي فتحت وقت إجراء التجربة (١٩) علبة		
	أنواع الجراثيم المعزولة	العدد	%	أنواع الجراثيم المعزولة	العدد	%
Nido 2 Dialac 2 Celia 1	*Escherichia coli*	3	8.57	*Enterobacter sakazakii*	1	2.85
Dialac 1 Cerilac 1	*Klebsiella pneumoniae*	2	5.71			
Dialac 2	*Aeromonas veronii*	1	2.85			
Biomil 2	*Aeromonas hydrophilia*	1	2.85			
Lery 1 Al-Badee 2	*Enterobacter sakazakii*	1	2.85			
Dialac 1	*Escherichia coli*	1	2.85			

جدول (3) : النسب المئوية للعدد الكلي للعينات الموجبة والسالبة المعزولة من عينات الحليب المختلفة

العدد الكلي للعلب	العينات ذات المزارع السالبة		العينات ذات المزارع الموجبة	
	العدد	%	العدد	%
35	25	71.41	10	28.58

كما يشير الجدول (2) ان أعلى نسبة عزل من الحليب المجفف كان من العلب المفتوحة قبل فترة من اخذ العينة بلغت ثلاثة أيام أو أكثر إذ تم الحصول على ثلاث عزلات لـ *Escherichia coli* وعزلتين *Klepsiella pneumoniae* وعزلة واحدة لكل من *Aeromonas veronii* و *Aeromonas hydrophilia* و *Enterobacter sakazakii* و *Shigella dysentri* ، مما يشير إلى ان تلوث عينات الحليب حدث أثناء التداول فيما تم الحصول على عزلة واحدة من *Enterobacter sakazakii* من علبة حليب فتحت مباشرة أثناء فتح العينة مما يشير إلى مقاومتها لعملية التسخين أثناء التصنيع والى عدم كفاءة عملية التعقيم (Pagotto *et al.*, 2009) .

وان نتائج هذه الدراسة جاءت مقاربة للنتائج التي حصل عليها الباحثون (Joshua *et al.*, 2005) اللذين قاموا بعزل هذه الجراثيم بنسبة (6.24%) لـ *Escherichia coli* و (6.80%) لكل من *Enterobacter sakazakii* و *Klebsiella pneumoniae* كأحد

ملوثات حليب الأطفال الخدج والرضع وأيضا من مسببات الإسهال والتهاب المعدة والأمعاء للأطفال بأعمار (٦-١١) شهراً ، واختلفت نتائج الدراسة مع دراسة (Forsythe and Iversen, 2008) وقد اكدت الدراستان ان أعلى نسبة لملوثات حليب الأطفال ظهرت لبكتريا *Bacillus cereus* إذ عزلت بنسبة (7.51%) والتي قد تظهر في الحليب أثناء تلوثه ، وأكد الباحثان ان سبب ظهورها بأعلى نسبة يرجع إلى إنتاجها للسبورات والذيفانات المقاومة للحرارة .

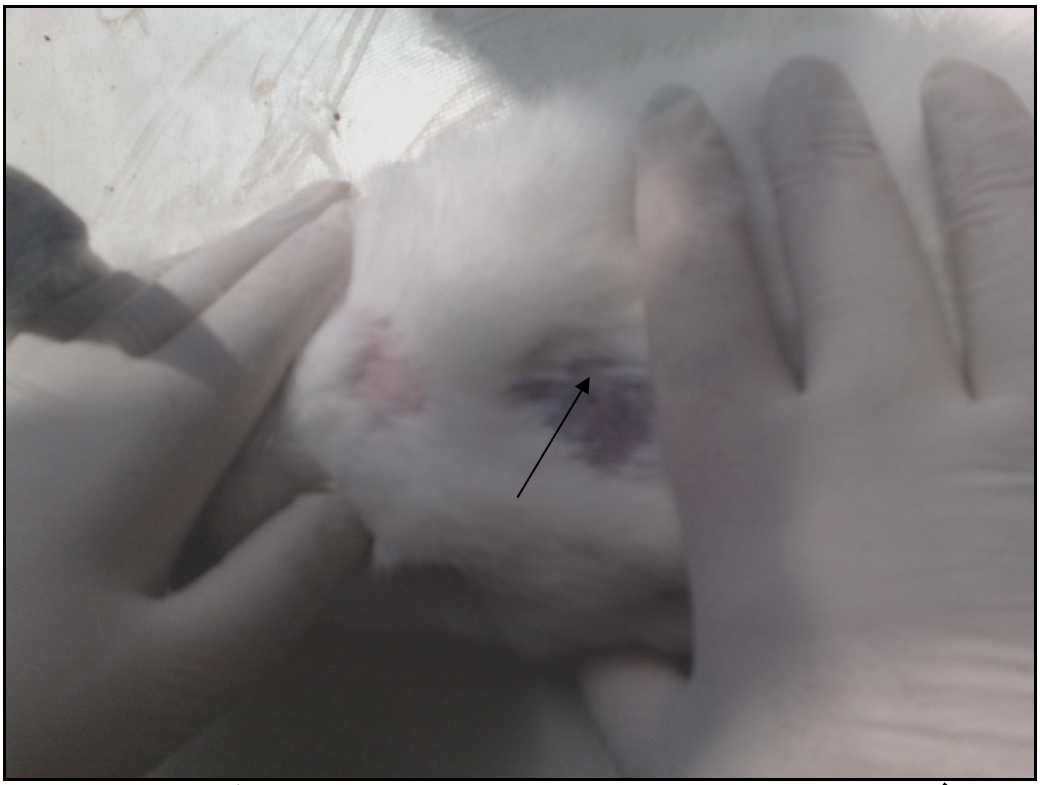
ان الحليب المجفف ربما يتعرض للتلوث بعد البسترة وقبل عملية التغليف أثناء المداولة وهذا ما ظهر لدينا من نتائج تلوث العلب المفتوحة أثناء إجراء الدراسة (العلب الجديدة) إذ ظهرت البكتريا *Enterobacter sakazakii* في العلب الجديدة ، ومن الممكن ان تتلوث علب الحليب أثناء التعبئة أي عن طريق المواد الخام والمواد الغذائية (مثل الفيتامينات والمعادن ... الخ) وممكن أيضا ان يتلوث الحليب أثناء تجهيز الوسط وعملية تشكيله في المرحلة الأخيرة بالمعدات والمعالجات (Simmons *et al*., 2006) .

اختبار النفاذية السريع والمتأخر لجلد الأرنب :

للتحري عن الذيفان الثابت حرارياً باستخدام اختبار النفاذية السريع لجلد الأرنب ، اعتمدت فيها طريقة (Sandefur & Peterson, 1976) سجلت النتيجة الموجبة للاختبار وبشكل مناطق دائرية زرقاء غير متقرنة بقطر (4) ملم بعد اقل من نصف ساعة من حقن الأرنب وريدياً بصبغة ايفان الزرقاء (Evan blue) والمحقونة بـ(0.1) سم٣ من الـ(CFCS) والـ(LS) لبكتريا *Enterobacter sakazakii* في منطقة الظهر قبل ساعة من حقن الصبغة ، ويمكن ملاحظة هذه النتيجة في الشكل (1) الذي يبين ظهور مناطق زرقاء غير متقرنة مقارنة بمناطق السيطرة التي حقنت بمرق نقيع القلب والدماغ المعقم والمناطق التي أعطت نتيجة سالبة للاختبار .

أما عامل النفاذية المتأخر للأرنب فتم ملاحظته بعد (48) ساعة من الحقن وسجلت النتيجة الموجبة اذ تكونت مناطق زرقاء متقرنة في مناطق الحقن مقارنة بمناطق السيطرة التي لم تظهر فيها هذه المناطق .

الشكل (١-أ) نتيجة موجبة لاختبار النفاذية السريع لجلد الأرنب (الذيفان الثابت حرارياً) بظهور مناطق زرقاء غير متقرنة



الشكل (١-ب) نتيجة سالبة لاختبار النفاذية السريع لجلد الأرنب (سيطرة)

اتفقت النتائج التي تم الحصول عليها مع نتائج الباحثين (Yang *et al*., 2009) الذين اثبتوا وجود عاملي النفاذية السريع (وهو الثابت حرارياً) والمتأخر (التالف بالحرارة) لجلد الأرنب في راشح المستعمرات الجرثومية الخالي من الخلايا لجرثومة *Enterobacter sakazakii* ، كما أشار الباحثون (Pagotto, 2009) إلى وجود علاقة بين إنتاج عامل النفاذية المتأخر لجلد الأرنب والسمية المتسببة عن الذيفان المعوي لجرثومة *Enterobacter sakazakii* وان هذه العلاقة بين عوامل النفاذية والذيفانات المعوية غير معروفة بصورة كاملة لحد الآن ، بينما ذكر الباحثون (Richardson and Smith, 2009) إن السلالات التابعة لجرثومة *Enterobacter sakazakii* التي تعطي نتيجة موجبة لاختبار النفاذية المتأخر لجلد الأرنب في بعض الأحيان تعطي نتيجة موجبة لاختبار النفاذية المتأخر لجلد الأرنب في بعض الأحيان فضلا عن انها تعطي نتيجة سالبة لعامل النفاذية السريع لجلد الأرنب (إنتاج الذيفان الثابت حرارياً) .

التحري عن إنتاج الذيفان المعوي التالف بالحرارة :

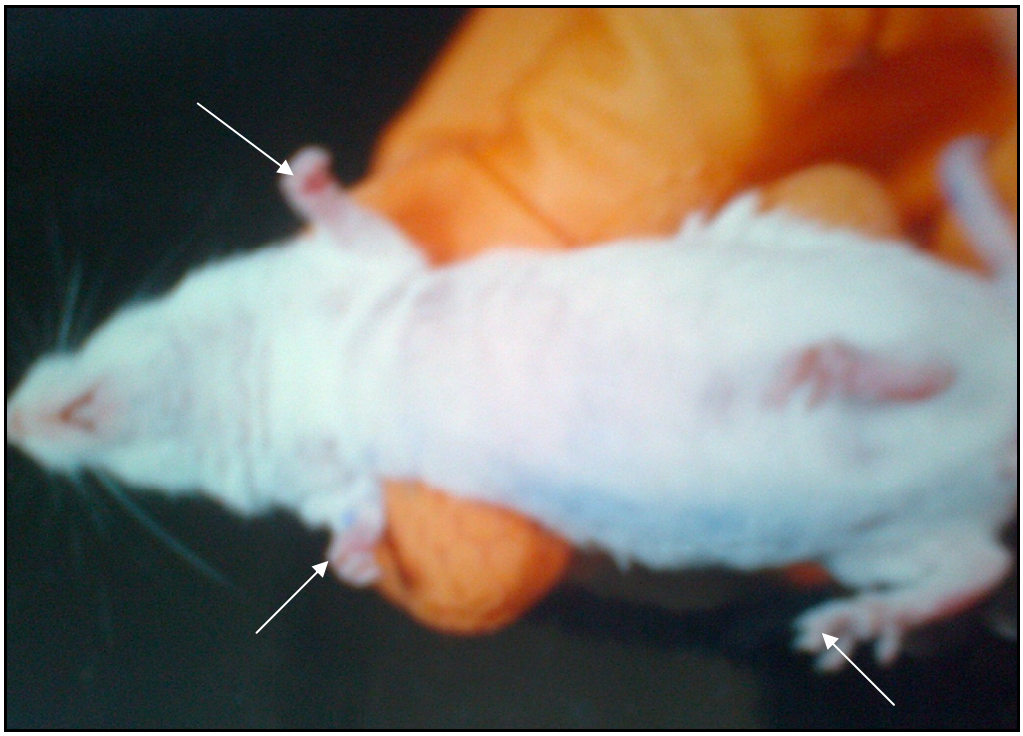
اختبار تورم اكف الفئران

تم إجراء هذا الاختبار حسب طريقة (Haren *et al*., 1990) والمحورة عن طريقة (Vartanyan *et al*., 1977) ، يبين الشكل (2) فأرة حقنت اكفها بـ(0.1)سم٣ من مرق نقيع القلب والدماغ المعقم اذ سجلت معدل سمك الأكف الأمامية والخلفية بعد (36) ساعة من الحقن (1)ملم و (1.1)ملم لكل من الأكف الأمامية والخلفية على التوالي ، وتم استخدام الفرنيا (Vernier calliper) لهذا الغرض وعند مقارنته بالشكلين (3) و (4) اللذين يوضحان السمك في اكف الفئران الأمامية والخلفية المحقونة بـ(0.1)سم٣ من الـ(CFCS) للبكتريا *Enterobacter sakazakii* وجد ان سمكها وصل إلى (2.7)ملم للأكف الأمامية في بعض المعاملات و(3.2) ملم في الأكف الخلفية في معاملات أخرى .

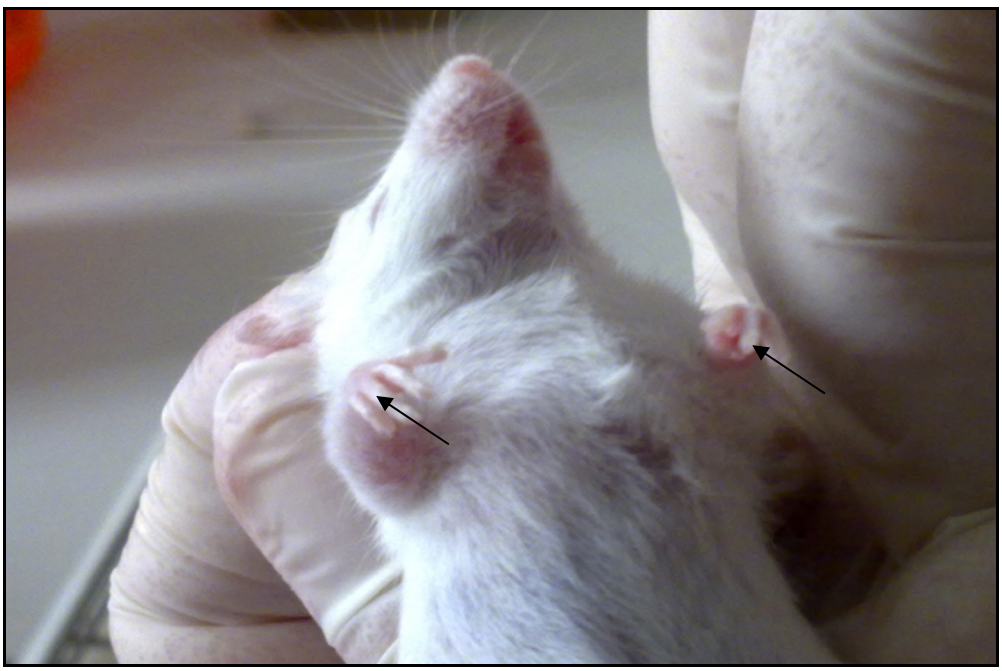
أما عند حقن (0.1)سم٣ من (LS) لبكتريا *Enterobacter sakazakii* تبين ان سمكها وصل أعلى ذروة له بعد 36 ساعة اذ وصل إلى (3)ملم لكل من الأكف الأمامية في بعض المعاملات و(4.2)ملم لكل من الأكف الخلفية في معاملات أخرى .

وعند ملاحظة كفاءة هذا الاختبار لتحديد السمية مع اختبار عامل النفاذية المتأخر لجلد الأرنب تبين أنها موازية للنتائج التي تم الحصول عليها مسبقاً وان هذين الاختبارين الاختباران ضروريان لتحديد سمية جرثومة *Enterobacter sakazakii* ، وان رائق الخلايا المتكسرة وراشح الخلايا الجرثومية السامين يعطيان نتيجة موجبة ، فضلاً عن انه يعد من الاختبارات الفعالة والاقتصادية للكشف عن الذيفان المعوي لجرثومة *Enterobacter*

sakazakii ، واثبت (Raghav *et al.*, 2007) استخدام الاختبار للكشف عن الذيفان التالف بالحرارة لجرثـــومتي *Escherichia coli* و *Enterobacter sakazakii* أدى إلـــى قتـــل الفئران بعد 48 ساعة من حقن اكفها بالمواد المراد اختبار سميتها .



الشكل (2) **اكف الفئران المحقونة بمرق نقيع القلب والدماغ المعقم (سيطرة)**



الشكل (3) **اكف الفئران الأمامية المحقونة بـ** CFCS **لبكتريا** *Enterobacter sakazakii* (**النتيجة الموجبة**)

الشكل (4) **اكف الفئران الخلفية المحقونة بـ** (CFCS) **لبكتريا** *Enterobacter sakazakii* (**النتيجة الموجبة**)

References:

1. Baroz, B.; Peleg, O. and Block, C. (2009). *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. Acta Pediatric, 90: 356-358.
2. FAO/WHO. (2008). *Enterobacter sakazakii* and other Microorganisms in powdered infant formula: Infectious Journal of Molecular Science, 1172-1175.
3. Forsythe, S. and Iversen, C. (2008). Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteria ceae from powdered infant formula milk and related products, Food Microbiology, 21: 771-773.
4. Harne SD, Sharma VD, Rahman H (1990). Paw oedema test for detection of Salmonella neterotoxins modification and standardization Indian J. Exp. Biol. 28:1141-1144.
5. Hoekstra, R. M.; Kuehnert, M. and McDonald, L. C. (2007). Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants National Center for infections Disease, USA, 5(1): 885-895.
6. Hostacka a, Maytan V, Majtanova I, (1993). Profile of toxic and biological activites of *Salmonella typhimurium* strains. Biologia, Bratislava, 48:677.
7. Joshua, B.; Jeffery, L.; Kornacki, B. and Larry, R. (2005). *Enterobacter sakazakii* : Acoliform of increased concern to infant heath, center for food dafety and Technology, Georgia, USA.
8. Kandhai, M; Reij, W.; Gorris, L. and Guillaume, O. (2009). Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production envieronmets and households. Lancet, 363-369.
9. Kleiman, M. B.; Allen, S. D. and Reynolds, J. (2009). Health professionals letter on *Enterobacter sakazakii* infections associated with use of powdered (Dry) infant formulas in Neonatal intensive care units, pediatric. 10: 557-558.
10. Koneman, E.; Washington Winn, J.; Allen, S.; Janda, W.; and Procop, G. (2006). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
11. Pagotto, F. (2009). Pathogenesis of cronobacter Enterotoxin production, Adherence and Invasion of the Blood-brain Barrier, Burenu of Microbiol hazards, Ireland.
12. Pagotto, F.; nazaeowec, W.; Bidawid, S. and Farber, J. (2008). *Enterobacter sakazakii* : Infectivity and Enterotoxin production in vitro and in vivo, Journal of Food production, 66(3): 370-375.
13. Plummer TD (1978). "An Introduction to practical Biochemistry".2nd ed. McGraw-Hill Book Company, U.K.

14. Raghar, Mamta and Aggarwal. (2007). Purification & Characterization of *Enterobacter sakazakii* enterotoxin, Canadian Journal Microbiology, 500-509.
15. Rahman H, Singh VB, Sharma VD and Harne SD (1992). *Salmonella* cytotxic and cytolytic factors : their detection in chines hamester ovary cells & antigentic relatedness. Vet. Microbiol., 31:379-387.
16. Richardson, A. and Smith, M. (2009). *Enterobacter sakazakii* virulence based on infection in neonatal mice, Journal of Emerging infectious disease, 7: 613-618.
17. Sandefar PD, Peterson JW (1976). Isolation of skin permeability factors from culture filtrates of *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun., 14: 671.
18. Simmons, B. P.; Gelfand, M. S.; Haas, M. and Ferguson, J. (2006). *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered milk formula, infectious control hospital epidemiology, 10: 398-401.
19. Townsend, S.; Hurrell, E. and Forsythe, S. (2008). Virulence studies of *Enterobacter sakazakii* isolates associated with aneonatal intensive care unit outbreak, Journal of Clinical Microbiology, 45: 3979-3985.
20. Vartanyan Y, Severtsora ML, Vedenskaya O, Starislavesky ES, (1977). Mockba, 85: 150, cited by Harne SD, Sharma VD & Rahmer H (1990). Paw odema test for detection of of Salmonella enterotoxin modification & standardization India. J. Exp. Biol. 28:1181.
21. Yang, J.; Wel, L.; Ming, G. and Fang, X. (2009). Identification of protein involved in infectivity and Enterotoxin production in *Enterobacter sakazakii*, Journal of rapid Methods & Automation in Microbiology, 17(2): 164-181.

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.