



جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الموصل / كلية العلوم

التقييم البكتريولوجي والجزئي لأنواع بكتريا *Cronobacter* spp.

المعزولة من حالات سريرية مختلفة لدى الأطفال دون السنتين من

العمر في مدينة الموصل / العراق

منتهى محمد صالح أحمد محمود العمري

رسالة ماجستير

علوم الحياة / أحياء مجهرية

إشراف

الأستاذ المساعد الدكتور

شاكر غازي جرجيس

Abstract الخلاصة

شملت الدراسة جمع (١٥٠) عينة [براز (٦٠)، دم (٦٠)، سائل النخاع الشوكي (٣٠)] سريرية من الأطفال دون عمر السنتين للمدة من (1/9/٢٠٢٣) إلى (1/12/٢٠٢٣) من مستشفيات مدينة الموصل (مستشفى ابن الاثير التعليمي ومستشفى الخنساء).

لغرض عزل وتشخيص أنواع *Cronobacter* إذ لُقحت العينات على وسط أكار الماكونكي ثم لُقحت المستعمرات التي أعطت اللون الوردي المخمرة لسكر اللاكتوز على وسط تربتون أكار الصويا ثم أكد التشخيص المظهري الأولي بالتلقيح على الوسط المولد للون Chromogenic media وشُخصت العزلات جميعاً اعتماداً على صفاتها المظهرية وباستخدام إختباري الكتاليز والأوكسيدز. تم استخدام جهاز الفايترك لتأكيد تشخيص الجنس حيث تم الحصول على (٨) عزلات تعود للجنس *Cronobacter* أي بنسبة (٥.٣%) من مجموع العينات ، ٤ (٦.٦%) عزلات من مرضى الالتهاب المعوي و ٤ (٦.٦%) عزلات مرضى تجرثم الدم، ولم يتم الحصول على أي عزلة من مرضى السحايا باستخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة، باستخدام الجين rRNA ١٦S تم الحصول على ٤ (٢.٦%) سلالات تابعة للنوع *C.sakazakii* موزعة على عزلتين من (٦٠) عينة أي بنسبة (٣.٣%) من عينات الدم وعزلتين من (٦٠) عينة أي بنسبة (٣.٣%) من عينات البراز وشخصت عزلتين تابعة للنوع *C. mulonaticus* أي بنسبة (٣.٣%) من عينات البراز وعزلة واحدة أي بنسبة (١.٦%) من عينات الدم لكل من النوعين *C. muytjensii* و *C. pulveris* وتم تأكيد التشخيص باستخدام جين تشخيصي آخر هو *rpoB* وتم تسجيل (٥) سلالات (*MUSHA1* و *MUSHA2* و *MUSHA3* و *MUSHA4* و *MUSHA5*) في بنك الجينات العالمي Gen Bank بأرقام الإنظام Accession Numbers (OR825874 ، PP126443 ، PP126444 ، PP126445) على التوالي.

تم إختبار حساسية العزلات ال (٨) تجاه عدد معين من المضادات الحيوية وقدرتها على إنتاج أنزيمات البيتا لالاكتاميز، وأظهرت العزلات مقاومة لكل من Amoxicillin ، Cephalixin ، Lincomycin ، Erythromycin ، Doxycycline ، Ampicillin–Cloxacillin ، Cephalothin و بنسبة ١٠٠% وكانت حساسة لكل من Cefotaxime ، Ceftriaxone ، Azithromycin و بنسبة ١٠٠% و Levofloxacin و Trimethoprim–Sulfamethazole ، Gentamycin ، Chloramphenicol و Ampicillin–Clavulanic acid بنسبة (١٠٠%). وأعطت مقاومة بنسبة (٦٣%) لا Ampicillin و (٥٠%) لمضاد Amikacin و (٢٥%) لمضادات Trimethoprim ، Streptomycin و Nitrofurantoin ، وأبدت العزلات جميعاً القدرة على إنتاج أنزيمات بيتا لالاكتاميز.

دُرست عوامل الضراوة المظهرية لأنواع Cronobacter فأظهرت جميع العزلات قدرتها على الحركة وبنسبة (١٠٠٪) وأنتجت أنزيمات haemolysin بنسبة (٨٨٪)، أنزيم Protease بنسبة (٦٣٪) وبنسبة (٢٥٪) لكل من Lipase و Lecithinase و (١٢.٥٪) لا Urease و (٠٪) للطبقة الغروية .

تم التحري عن قدرة أنواع Cronobacter على إنتاج الغشاء الحيوي وأظهرت العزلات القدرة على إنتاج الغشاء الحيوي بطريقة الأنابيب بين (٧٥٪) شديدة التكوين و (١٢.٥٪) متوسطة التكوين و (١٢.٥٪) غير مكونة للغشاء الحيوي بينما أظهرت العزلات جميعاً القدرة على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة صفيحة المعايرة الدقيقة فكانت (٧٥٪) شديدة التكوين، (١٢.٥٪) متوسطة التكوين و (١٢.٥٪) منها ضعيفة التكوين للغشاء الحيوي.

دُرست تأثير درجات الحرارة المختلفة على نمو عزلات أنواع Cronobacter إذ أظهرت العزلات انخفاضاً للنمو عند درجة الحرارة (٥٠) م° مقارنة مع درجتي حرارة (٢٥ و ٣٧) م°، ودُرست تأثير الرقم الهيدروجيني على نمو العزلات جميعاً ف لوحظ إنخفاض النمو البكتيري عند الرقم الهيدروجيني القاعدي (pH = 9) بالمقارنة مع الرقم الهيدروجيني الحامضي (pH = 4) والمتعادل (pH = 7) .

أُجري التحري عن بعض الجينات المشفرة لعوامل ضراوة أنواع Cronobacter باستخدام تقنية PCR فأظهرت السلالات جميعاً إمتلاكها للجينين *ompA* و *zpx* بينما أظهرت سلالات *C.sakazakii* إمتلاكها لجيني الضراوة *hly* و *cpa* فيما تواجد الجين *sip* في سلالاتي *C.malonaticus* فقط .

يتضمن المحور الأخير دراسة ضراوة بكتريا Cronobacter داخل الجسم الحي باستخدام الفئران الرضيعة، وذلك من خلال دراسة تأثير راشح السم المعوي المستخلص من عزلات *C. sakazakii* و *C. malonaticus* إذ أعطت سلالة واحدة من بكتريا *C. sakazakii* نتيجة إيجابية لتأثير السم المعوي. دُرست تأثير البكتريا الحية على الفئران الرضيعة المحقونة تحت الصفاق بتركيز (١٠^٧) خلية/مل وتم ملاحظة خمول وإنخفاض في الرضاعة وقلة الوزن وتغير لون الجلد ونفوق إثنان من الفئران المحقونة لسلالتين من *C. sakazakii*. خُضرت المقاطع النسيجية من أعضاء (الكبد، الدماغ، الجزء السفلي للقناة المعدية المعوية) وفُحصت تحت المجهر الضوئي المركب وتبين وجود ضرر في نسيج الكبد مع حدوث نخر وتفرغ للخلايا الكبدية وإحتقان الأوردة وتمدها. أظهرت المقاطع النسيجية للدماغ وجود وذمة وحيز محيط بالأوعية الدموية وإحتقانها وإحتقان الخلايا العصبية مع وجود بؤر إتهابية وتنكس للخلايا العصبية لقشرة الدماغ . أظهر الجزء السفلي للقناة المعدية المعوية وجود خلايا إتهابية مع تفرغ ونخر الخلايا المعوية وتضخم الخلايا الليفية ووجود وذمة بين الزغابات .

Abstract:

The study included the collection of (150) clinical specimens [stool (60) , blood (60) , cerebrospinal fluid (30)] from children under the age of two years for the period from 1/9/2023 to December 1/12/2023 from hospitals in the city of Mosul (Ibn Al-Atheer Teaching Hospital And Al-Khansa Hospital).

For the purpose of isolating and identifying *Cronobacter* spp The specimens were selected and inoculated onto MacConkey Agar medium, then the colonies that gave the pink color were inoculated on Tryptone Soy Agar medium, then the initial phenotypic identify was confirmed by inoculation on the color-generating medium.(Chromogenic media). All isolates were identified based on their phenotypic characteristics and using the catalase and oxidase tests. The Vitek system was used to confirm the genus identify. Eight isolates of the genus *Cronobacter* were obtained, i.e. (5.3%) of the total specimens. (4) isolates (6.6%) were from patients with intestinal infections and (4) isolates (6.6%) were obtained from patients with bacteremia, and no isolates were obtained from patients with meningitis. Using polymerase chain reaction techniques and using 16S rRNA, (4) strains (2.6%) belonging to the species *C. sakazakii* were obtained, distributed among two isolates from (60) specimens, i.e. (3.3%) of the blood specimens, and two isolates from (60) specimens, i.e. (3.3%) of the stool samples, and two isolates belonging to the type were identified. *C. mulonaticus*, i.e.(3.3%) of the stool specimens, and one isolate, i.e. (1.6%) of the blood specimens, for each of the two types: *C. muytjensii* and *C. pulveris*. The diagnosis was confirmed using another diagnostic gene, *rpoB*. (5) strains were recorded (MUSHA1, MUSHA2, MUSHA3, MUSHA4 and MUSHA5) in Gen Bank with accession numbers (OR825874, OR825875, PP126443, PP126444, PP126445) respectively.

The sensitivity of the eight isolates to a certain number of antibiotics and their ability to produce β -lactamase enzymes were tested, and the isolates showed resistance to Cephalexin, Amoxicillin, Cephalothin, Ampicillin - Cloxacillin, Doxycycline, Erythromycin, Lincomycin at a rate of (100%) and was sensitive to Azithromycin, Ceftriaxone, Cefotaxime, Chloramphenicol, Gentamicin, Trimethoprim - Sulfamethazole , Levofloxacin and Ampicillin - Clavulanic acid at a rate of (100%). It gave (63%) resistance to Ampicillin , (50%) to Amikacin and (25%) to Trimethoprim, Streptomycin and Nitrofurantoin. All isolates showed the ability to produce β -lactamase enzymes.

The phenotypic virulence factors of the species were detected. All *Cronobacter* isolates showed (100%) motility and produced enzymes

Heamolysin (88%), Protease enzyme (63%), Lipase and Lecithinase (25%), Urease (12.5%), and slime layer (0%).

The ability of Cronobacter isolates to biofilm production has been detected, the isolates showed the ability to produce biofilm using the tube method, with (75%) being highly formed, (12.5%) moderately, and (12.5%) not producing to biofilm, while all isolates showed the ability to produced biofilm by using the microtiter plate method, so (75%) were highly forming, (12.5%). moderate biofilm formation and (12.5%) week biofilm formation.

The effect of different temperatures have been studied on the growth of isolates of the species Cronobacter as (50)°C showed a decrease in growth compared to the temperature (25 and 37)°C. The effect of pH on the growth of all isolates was studied, and a decreased in bacterial growth was observed at the basic pH (pH = 9) compared to acidic (pH = 4) and neutral (pH = 7).

An investigation was conducted for some genes encoding virulence factors of certain species Cronobacter using PCR technology showed that all strains possessed the *zpx* and *ompA* genes, while the *C.sakazakii* strains showed that they possessed the *hly* and *cpa* virulence genes, while the *sip* gene was present in *C.malonaticus* isolates only.

The last axis includes studying the virulence of bacteria Cronobacter In vivo, using infant mice, by studying the effect of enterotoxin filtrate extracted from *C. sakazakii* and *C. malonaticus* isolates, as one strain of *C. sakazakii* bacteria gave a positive result for the effect of enterotoxin. The effect of live bacteria on infant mice injected intraperitoneal at a concentration of (10^7) cells/ml was studied. Lethargy, decreased lactation, weight loss, change in skin color, and death of two mice injected with two strains of *C. sakazakii* were observed. Organs (liver, brain, lower part of the gastrointestinal tract) were dissected and taken. For histological study, tissue sections were prepared and examined under a compound light microscope. It was found that there was damage to the liver tissue, with necrosis and vaculation of the liver cells, congestion and expansion of the veins. Histological sections of the brain showed the presence of edema, perivascular space and congestion of nerve cells with the presence of inflammatory foci, degeneration and necrosis of neurons of the cerebral cortex, and the lower part of the gastrointestinal tract showed the presence of inflammatory cells with vaculation and necrosis of intestinal cells, hyperplasia of fibrous cells, and the presence of edema between the villi.

2024 A.D.

1446 A.H

The Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and

Scientific Research

University of Mosul / College of Science

Department of biology



**Bacteriological and molecular evaluation of
Cronobacter spp. isolated from different clinical cases in
children under two years in Mosul city / Iraq**

Muntaha Mohammad Salih Ahmad Mahmood Alumary

M.Sc. /Thesis

Biology / Microbiology

Supervised by

Assistant Prof. Dr. Shakir Ghazi Gergees