دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۳، صفحه ۲۷۹ – ۲۷۲ (مرداد و شهریور ۱۳۹۳)

ISMJ 2014; 17(3): 272-279

شناسایی انتروباکتر ساکازاکی در نوزادان مبتلا به سپسیس با استفاده از PCR بر روی ژن 16S ribosomal RNA

خدیجه احمدی [۱]، احمد فرج‌زاده شیخ [۱*]، جلال مردانه [۲]، فرزان مدرسی [۳]، سعید شجاع [۱]

[۱] گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
[۲] مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی، بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
[۳] گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

(دریافت مقاله: ۹۱/۲/۲۹- پذیرش مقاله: ۹۱/۶/۱۵)

چکیده

زمینه: انتروباکتر ساکازاکی باسیلی گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و متعلق به خانواده انتروباکتریاسیه است که به‌عنوان پاتوژن فرصت‌طلب مهم مطرح و سبب بیماری‌های مختلف از جمله سپسیس، مننژیت، انتروکولیت نکروزان و باکتریمی در نوزادان می‌گردد. هدف از این بررسی شناسایی انتروباکتر ساکازاکی در نوزادان مبتلا به سپسیس با استفاده از PCR بر روی ژن 16S ribosomal RNA بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مقطعی طی شهریور ۱۳۹۰ تا اردیبهشت ۱۳۹۱، بر روی تعداد ۴۰۵ نمونه خون از نوزادان مشکوک به سپسیس بستری در بیمارستان ابوذر شهرستان اهواز انجام گردید. از هر نوزاد پیش از دریافت آنتی بیوتیک ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه خون در لوله‌های CBC حاوی EDTA جمع‌آوری و در فریز ۲۰- به‌منظور انجام آزمایش PCR ذخیره گردید. به‌منظور تکثیر توالی DNA ژن 16S ribosomal RNA باکتری انتروباکتر ساکازاکی استفاده گردید.

یافته‌ها: نتیجه واکنش PCR بر روی ژن 16S rRNA انتروباکتر ساکازاکی به‌منظور شناسایی این ارگانیسم در نمونه خون تمام بیماران منفی بود. کشت خون در ۸ (۱/۴ درصد) بیمار از نظر استرپتوکوکوس آگالاکتیه مثبت بود.

نتیجه‌گیری: از آنجایی که انتروباکتر ساکازاکی یک فرصت طلب با قدرت بیماری‌زایی بالا می‌باشد، انجام مطالعات گسترده‌تر در گروه‌های در معرض خطر ارزش زیادی دارد و به‌منظور دستیابی به این مهم از چندین روش تشخیصی کارآمد و مطالعه روی جمعیت بزرگ‌تری می‌باشد. از سویی دیگر استفاده از چندین روش تشخیصی با حساسیت و ویژگی بالا در تشخیص موارد بیشتر عفونت ناشی از این باکتری ضروری است.

واژگان کلیدی: انتروباکتر ساکازاکی، نوزاد، سپسیس، PCR

* اهواز، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

Email :farajzadehah@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

انتروباکتر ساکازاکی (*Enterobacter sakazakii*) باسیلی گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، فاقد اسپور و متعلق به خانواده انتروباکتریاسیه است که به‌طور وسیع در طبیعت و مجرای روده‌ای حیوانات و انسان یافت می‌شود (۱).

در ابتدا بر اساس ویژگی‌های مورفولوژی این نوع باکتری به‌عنوان انتروباکتر کلوآکه تولید کننده پیگمان زرد شناسایی شد. از این رو استگروالت (Steigerwalt) و همکاران عنوان نمودند که خصوصیات سویه‌های تولید کننده پیگمان و غیر تولید کننده پیگمان متفاوت است و به این نتیجه رسیدند که این دو سویه نباید تحت عنوان یک تیپ طبقه‌بندی شوند (۲). در سال ۱۹۸۰، فارمر (Farmer) و همکاران این باکتری را تحت عنوان انتروباکتر ساکازاکی نام‌گذاری کردند (۱).

گزارش‌های بعدی (۵-۳) نشان داد که این ارگانیسم، باکتری بالقوه خطرناک است که از راه شیرهای خشک مصرفی آلوده به نوزادان منتقل می‌گردد و سبب بیماری‌های مختلف از جمله منژیت، آبسه‌های مغزی، انتروکولیت نکروزان، آنسفالیت، منگوآنسفالیت نکروز دهنده، باکتریمی و سپسیس در نوزادان به‌ویژه نوزادان پیش از موعد متولد شده، نوزادان با سیستم ایمنی سرکوب شده و نیز نوزادانی که دارای وزن کم در هنگام تولد می‌گردد (۶). اگر چه شواهد اپیدمیولوژیکی در ارتباط با دوز عفونت‌زای این باکتری وجود ندارد اما شمار تقریبی را ۱۰۰۰ ارگانیسم می‌دانند که بسیار پایین بوده و همانند دوز عفونی باکتری‌های پاتوژنی همچون لیستریا مونوسایتوژنز (*Listeria monocytogenes*)، اشریشیاکلی O157، و نایسریا منژیتیدیس (*Neisseria meningitidis*) می‌باشد (۷ و ۸).

در موارد شدید انتروباکتر ساکازاکی سبب هیدروسفالی و منژیت با نتایج نورولوژیکی شدید و میزان مرگ ومیر ۴۰ تا ۵۰ درصد می‌باشد. در ژاپن باکتری سبب چندین مورد آبسه مغزی در سال ۲۰۰۷ و سپسیس در سال ۲۰۰۹ گردید (۹ و ۱۰).

گونه‌های مختلف انتروباکتر از جمله انتروباکتر ساکازاکی، انتروباکتر آگلومرنس، انتروباکتر کلوآکه ارگانیسم‌هایی هستند که در همه جا حاضر بوده و از مکان‌های گوناگونی همچون غذاها (از جمله شیرهای خشک، مواد لبنی)، آب، خاک و مکان‌های دیگر نظیر خانه‌ها و بیمارستان‌ها جدا گشته‌اند (۱۱ و ۱۲). در مقالات اخیر گزارش شده است که انتروباکتر ساکازاکی در موارد زیادی از شیرهای نگهداری شونده در بانک شیر وجود دارد (۱۳). بخش عمده‌ای از عفونت‌های انتروباکتر ساکازاکی در بیمارستان‌ها در بخش‌های مراقبت‌های ویژه نوزادان (NICU) رخ می‌دهد. نگهداری شیر خشک تهیه شده و حل شده در دمای اتاق برای مدت طولانی در واقع خطر عفونت را افزایش می‌دهد (۶).

انتروباکتر ساکازاکی پاتوژنی فرصت‌طلب و بالقوه بیماری‌زا به‌ویژه در نوزادان می‌باشد. بیماری‌های عنوان شده بیشتر در نوزادان زیر ۱۲ ماه به‌ویژه در نوزادان متولد شده پیش از موعد، نوزادان دارای کمبود وزن در زمان تولد و نوزادن با ایمنی سرکوب شده رخ می‌دهد (۱۴). چون این گروه افراد بیشتر به سپسیس باکتریایی ناشی از باکتری‌های گرم منفی و اندوتوکسمی مرتبط با انتروکولیت نکروزان حساس می‌باشند (۱۵ و ۱۶). از آنجایی که در بسیاری از موارد به‌دلیل عدم نمونه‌گیری مناسب و به موقع و نبود امکانات پیشرفته تشخیصی در آزمایشگاه‌های بالینی و نیز از نظر دور ماندن عفونت ناشی از انتروباکتر ساکازاکی توسط پزشکان، اهمیت بیماری‌های ناشی از این ارگانیسم نادیده گرفته می‌شود، هدف از این بررسی شناسایی انتروباکتر ساکازاکی در

Archive of SID

www.SID.ir

نوزادان مبتلا به سپسیس با استفاده از PCR بر روی ژن 16S ribosomal RNA می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جامعه مورد مطالعه

در این مطالعه مقطعی که طی شهریور ۱۳۹۰ تا اردیبهشت ۱۳۹۱ انجام شد، تعداد ۴۰۵ نمونه خون از نوزادان مشکوک به سپسیس بستری در بیمارستان ابوذر شهرستان اهواز به‌عنوان جامعه مورد مطالعه انتخاب گردیدند و برای هر یک پرسشنامه تنظیم شده و کدگذاری گردید. نمونه‌گیری از افراد پس از مشخص نمودن هدف مطالعه برای آنها و کسب رضایت کتبی آگاهانه از هر یک از افراد تحت مطالعه صورت گرفت.

روش نمونه‌گیری

از هر نوزاد مورد مطالعه، جهت مطالعه ملکولی در دورهای تب، قبل از دریافت آنتی‌بیوتیک ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه خون محیطی در لوله‌های CBC حاوی EDTA جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه تا زمان انجام آزمایش‌های ملکولی در فریزر ۲۰- ذخیره گردید. همچنین به‌طور همزمان جهت انجام کشت خون میزان ۲ تا ۳ میلی‌لیتر خون محیطی جمع‌آوری گردید و کشت با استفاده از شیشه‌های کشت خون معمولی در مرحله اول و سپس ساب کالچر بر روی محیط‌های معمول میکروب‌شناسی شامل بلاد آگار، شکلات آگار، مک کانکی آگار و ائورین متیلن بلو آگار[1] انجام شد.

انجام آزمایش PCR

نمونه‌های خون گرفته شده از نوزادان به‌منظور آزمایش PCR از فریزر ۲۰- خارج و اجازه داده شد تا به دمای اتاق برسند سپس با استفاده از کیت تجاری استخراج DNA ساخت شرکت Fermentas از خون ذوب شده DNA مورد نیاز استخراج گردید و به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر مقدار DNA استخراج شده مورد ارزیابی قرار گرفت. از پرایمرهای

Esak 2 5´-CCC GCA TCT CTG CAG GAT TCT C-3
Esak 3 5´-CTA ATA CCG CAT AAC GTC TAC G-3´

به‌منظور تکثیر توالی DNA ژن 16S ribosomal RNA باکتری انتروباکتر ساکازاکی استفاده گردید GenBank(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) (Accession number AB004746) (۱۷) که در نتیجه تکثیر در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز قطعه‌ای ۹۰۰bp حاصل می‌گشت. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر متشکل از ۰/۷۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰mM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱ میکرولیتر MgCl2 (۵۰mM)، ۱۸/۳ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، ۱ میکرولیتر نمونه DNA و در نهایت ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA پلی‌مراز (شرکت Fermentas) در طی ۳۵ سیکل با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (اپندورف) انجام گردید، به‌عنوان کنترل منفی در یک میکروتیوب به‌جای اضافه نمودن نمونه DNA، آب مقطر اضافه گردید. هر چرخه واکنش PCR شامل مرحله دناچوریشن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه، آنلینگ در دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه انجام گشت و یک مرحله اکستنشن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه نیز اعمال گردید. بهینه نمودن دمای آنلینگ با استفاده از برنامه گرادیانت دستگاه PCR و تنظیم روی دماهای مختلف به‌منظور دست‌یابی به بهترین نتیجه انجام شد. محصول PCR با استفاده از آگارز ۱ درصد روی دستگاه الکتروفورز حاوی بافر 1xTAE الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی ژل با

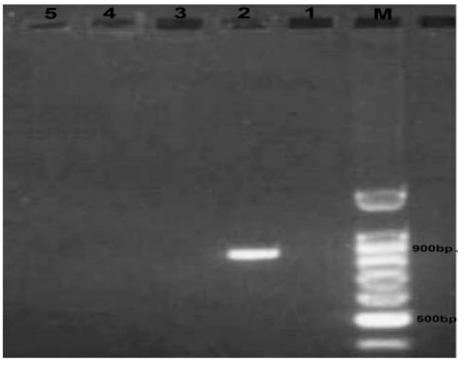
[1] Eosin-methylene Blue (EMB) Agar

www.SID.ir
Archive of SID

اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه ترانسلومیناتور به‌منظور جستجو باند ۹۰۰bp مورد آنالیز قرار گرفت و پس از ذخیره اطلاعات تفسیر نتایج انجام شد. طی این مطالعه از انتروباکتر ساکازاکی سویه استاندارد CDC 78-067947 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده و استخراج ژنوم آن به‌کمک روش Boiling انجام شد.

یافته‌ها

از ۴۰۵ نوزاد مبتلا به سپسیس بستری در بیمارستان که تشکیل دهنده جامعه مورد مطالعه بودند ۲۶۸ مورد (۶۶/۲ درصد) پسر بودند. وزن نوزادان بین ۵۰۰ تا ۴۵۰۰ گرم بود. نتیجه آزمایش PCR بر روی ژن 16S rRNA انتروباکتر ساکازاکی به‌منظور شناسایی این ارگانیسم در نمونه خون تمام بیماران منفی بود (شکل ۱). از نمونه خون گرفته شده به‌طور همزمان از نوزادان مورد مطالعه جهت انجام کشت خون بر روی محیط‌های باکتریولوژی معمولی در ۱/۴ درصد موارد استرپتوکوکوس آگالاکتیه و در ۱۲درصد موارد کلبسیلا جدا گشت.



شکل ۱) شناسایی *Enterobacter sakazakii* در نمونه‌های خون گرفته شده از نوزادان مبتلا به سپسیس با استفاده از انجام PCR بر روی ژن 16S ribosomal RNA به کمک پرایمرهای اختصاصی. ردیف M : سایز مارکر ۱۰۰bp، ردیف ۱: کنترل منفی، ردیف ۲: کنترل مثبت، ردیف‌های ۳، ۴، ۵ : نمونه‌های منفی.

بحث

انتروباکتر ساکازاکی که امروزه تحت نام جنس جدیدی به نام کرونوباکتر ساکازاکی مطرح است، باسیلی گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه و به‌عنوان پاتوژنی فرصت طلب و مهم در عفونت‌های نوزادی مانند سپسیس، مننژیت، باکتریمی و انتروکولیت نکروزان می‌باشد و با مصرف پودر شیر خشک همراهی دارد (۱۲، ۲۱–۱۸).

خطر ابتلا به عفونت وابسته به چندین عامل همچون تعداد باکتری‌های موجود در محصول مصرفی، رسیدگی پس از تهیه و ویژگی‌های زمینه‌ای بیمار (نظیر سرکوب سیستم ایمنی، تولد پیش از موعد و دارای کمبود وزن در زمان تولد) می‌باشد (۲۲). یافته‌های منفی واکنش PCR در بررسی کنونی نشان می‌دهد که به‌دلیل پایین بون میزان شیوع عفونت ناشی از این باکتری نیاز به انجام مطالعه بر روی جامعه آماری بسیار وسیع‌تر و با مدت زمان طولانی‌تر می‌باشد. از سویی دیگر انجام کشت خون با استفاده از سیستم‌های کشت خون خودکار که دارای ترکیبات غنی کننده زیادی بوده جهت جداسازی ارگانیسم دارای اهمیت فراوان می‌باشد و در نتیجه آن امکان انجام آنتی‌بیوگرام بر روی سویه‌های ایزوله شده به‌منظور دستیابی به درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب فراهم می‌گردد.

از آنجایی که در کشور ما در آزمایشگاه‌های بالینی بیمارستان‌ها سیستم‌های خودکار کشت خون از جمله سیستم BACTEC وجود ندارد و کشت خون بر اساس سیستم‌های کشت خون معمولی سنتی انجام می‌شود، شانس جداسازی ارگانیسم بسیار کاهش می‌یابد. از سویی دیگر به‌دلیل مصرف خوسرانه دارو پیش از مراجعه به پزشک در بسیاری از موارد آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی رشد باکتری را به‌طور نسبی مهار نموده و اجازه رشد به باکتری در شیشه‌های کشت خون معمولی را نمی‌دهد، ولی در سیستم کشت

Archive of SID

www.SID.ir

خون BACTEC به‌دلیل وجود ترکیباتی به نام رزین، اثر آنتی‌بیوتیک‌های موجود در نمونه خون مهار شده و باکتری فرصت رشد پیدا می‌نماید. علاوه‌بر این جستجوی ارگانیسم در نمونه‌های دیگر نوزادان مشکوک به عفونت ناشی از انتروباکتر ساکازاکی و افراد دچار نقص سیستم ایمنی دارای اهمیت می‌باشد.

در مجموعه گزارشات هفتگی CDC در زمینه میزان Mortality و Morbidity در آوریل ۲۰۰۲ خلاصه‌ای از تحقیقات روی عفونت کشنده مرتبط با با انتروباکتر ساکازاکی را نوزادان بستری شده در بیمارستان بیان می‌نماید که عفونت مرتبط با حضور ارگانیسم در پودرهای تجاری شیر خشک مصرفی نوزادان بوده است. در این گزارش یک مطالعه هم‌گروهی بر ۴۹ بیمار به‌منظور بررسی عوامل خطر مرتبط باابتلا به عفونت یا کلونیزاسیون ناشی از انتروباکتر ساکازاکی پرداخته است که یافته‌های مطالعه نشان داده که آلودگی در ارتباط با مصرف پودر شیر خشک خاصی می‌باشد (۲۲).

در بررسی‌های انجام شده توسط کابیلا-بارون (Caubilla-Baron) و همکاران در سال ۲۰۰۷ به بررسی عوامل ایجاد کننده شیوع انتروکولیت نکروزان (NEC) و عفونت‌های تهاجمی در بخش NICU یک بیمارستان می‌پردازند و نشان داده‌اند که شیوع بیماری در نتیجه انتروباکتر ساکازاکی بوده است. در این دوره ۳ ماهه شیوع بیماری ۱۸ بیمار عفونی شده به‌صورت بدون علامت با باکتری کلونیزه شده‌اند که منجر به مرگ ۴ مورد از بیماران گشته است. همه نوزادان آلوده به استثناء یک مورد پیش از موعد متولد شده بودند. ۹ مورد از نوزادان دارای علائم بالینی شدید بودند که از این بین ۷ مورد دارای انتروکولیت نکروزان (NEC) با پرفوراسیون شکمی بوده و یک مورد به سپتی سمی و یک مورد نیز به منتژیت مبتلا شده بودند. سویه‌های جدا شده با استفاده از ۱۶S rRNA مورد تأیید نهایی از نظر انتروباکتر ساکازاکی قرار گرفتند (۲۴).

با توجه به منفی شدن کشت‌های خون در مطالعه کنونی، نیاز است که مطالعات کشت و ملکولی علاوه‌بر نمونه‌های خون، با توجه به درگیر شدن ارگان‌های مختلف توسط این باکتری، روی نمونه‌های دیگر جمع‌آوری گشته از نوزادان انجام شود. از آنجایی که شیر خشک استریل نمی‌باشد و می‌تواند محیطی مناسب جهت رشد میکروارگانیسم‌ها فراهم نماید دوره نگهداری طولانی مدت یا adminstration در دمای اتاق ممکن است سبب تکثیر و در نتیجه افزایش باکتری‌های موجود در شیر خشک گردد (۲۲).

کمیته بین‌المللی اختصاصی نمودن میکروبیولوژی برای غذاها، انتروباکتر ساکازاکی را به‌عنوان یک خطر بالقوه تهدید کننده زندگی یا عواقب مزمن قابل توجه یا دوره طولانی برای جمعیت مشخص طبقه‌بندی نموده است (۲۳). از آنجایی که این باکتری یک فرصت‌طلب با قدرت بیماری‌زایی بالا می‌باشد، انجام مطالعات گسترده‌تر در گروه‌های در معرض خطر ارزش زیادی دارد. از سویی دیگر استفاده از چندین روش تشخیصی با حساسیت و اختصاصیت بالا می‌تواند در تشخیص موارد بیشتر عفونت ناشی از این باکتری ارزشمند باشد، همچنین مطالعه همزمان بر روی نمونه‌های مختلف جمع‌آوری شونده از بیماران بسته به ارگان درگیر شونده، نیز دارای اهمیت است. از آنجایی‌که انتروباکتر ساکازاکی همانند برخی گونه‌های دیگر انتروباکتریاسیه نظیر سالمونلا، شیگلا و یرسینیا دارای توانایی بیماری‌زایی بالقوه بوده و از طریق مواد غذایی نیز منتقل می گردند، از این مسیر ممکن است به انسان منتقل شده یا وارد محیط‌های بیمارستانی

Archive of SID

www.SID.ir

گردند و بیماران بستری را نیز آلوده نمایند (۲۵). از سویی دیگر در محیط بیمارستان در مجاورت با باکتری‌های مقاوم به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی (نظیر کلبسیلا، اشریشیاکلی، انتروباکتر، اسینتوباکتر، پسودوموناس) (۲۶ و ۲۷) موجود در این مکان، ژن‌های مقاومت را کسب و به پاتوژن‌هایی با مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا تبدیل شوند و در نتیجه مشکلات درمانی را به همراه خواهند داشت.

References:

1.Farmer JJ, Asbury MA, Hickman FW, et al. *Enterobacter sakazakii*: a new species of "*Enterobacteriaceae*" isolated from clinical specimens. Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 569-84.

2.Steigerwalt AG, Fanning GR, Fife-Asbury MA, et al. DNA relatedness among species of *Enterobacter* and *Serratia*. Can J Microbiol 1976; 22: 121-37.

3.Drudy D, Mullane NR, Quinn T, et al. *Enterobacter* sakazakii: an emerging pathogen in powdered infant formula. Clin Infect Dis 2006; 42: 996-1002.

4.Lai KK. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults: case reports and a review of the literature. Medicine 2001; 80: 113-22.

5.Forsythe SJ. *Enterobacter sakazakii* and other bacteriain powdered infant milk formula. Matern Child Nutr 2005; 1: 44-50.

6.Emek DUMEN. *Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii*): Only An Infant Problem? KafKas Univ Vet Fak Derg 2010; 16: S171-8.

7.Baumgartner A, Grand M, Liniger M, et al. Detection and frequency of Cronobacter (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula. Int J Food Microbiol 2009; 136: 189-92.

8.Iversen C, Forsythe S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. Trenda in Food Science & Technology 2003; 14: 443-54.

9.Ibuki K, Hashida Y, Shimura S, et al. a case of multiple brain abscess in a very low birth weight infant caused by *Enterobacter sakazakii*. J soc Perinatal Med 2009; 45: 129-33.

10.Teramoto T, Tanabe T, Okano E, et al. A case of sepsis in a low birth weight infant caused by *Enterobacter sakazakii*. J Jpn Soc Perinatal Neonatal Med 2009; 45: 718.

11.Mardaneh J, Dallal MM. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Pantoea* (*Enterobacter*) *agglomerans* isolated from consumed powdered infant formula milk (PIF) in NICU ward: First report from Iran. Iran J Microbiol 2013; 5: 263-7.

12.Fiore A, Casale M, Aureli P. *Enterobacter sakazakii*: Epidemiology, clinical presentation, prevention and control. Ann Ist Super Sanita 2008; 44: 275-80.

13.ISDI (International special dietary Foods Industries). Background information on *Enterobacter sakazakii*. (Accessed 2004, at http://www.awex.be/NR/rdonlyres/A3A18BBA-F13C-4D36-97B1-26519CB2E9EA/4055/Enterobacter.)

14.Food and Agriculture Organization-World Health Organization (FAO-WHO). *Enterobacter sakazakii* and other microorganism in powdered infant formula. Meeting report, MRA series 10. World Health Organization. Geneva. Switerland. (Accessed 2006, at http://www.who.int/foodsafety/publiccations/ micro/ mra10/en/index.html.)

15.Beck-sague CM, Azimi P, Fonseca SN, et al. Bloodstream infections in neonatal intensive care unit patients: results of a multicenter study. Pediatr Infect Dis J 1994; 13: 1110-6.

16.Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, et al. *Enterobacter sakazakii* is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in VLBW infants. J Pediatr 2004; 1444: 821-3.

17.Keyser M, Witthuhn RC, Ronquest LC, et al. Treatment of winery effluent with upflow anaerobic sludge blanket (UASB)-granular sludges enriched with *Enterobacter sakazakii*. Biotechnol Lett 2003; 25: 1893-8.

18.Simmons BP, Gelfand MS, Haas M, et al. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of powdered infant formula. Infect control Hosp Epidemiol 1989; 10: 398-401.

19.Biering G, Karlsson S, clark NC, et al. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. J Clin microbiol 1989; 27: 2054-6.

20.Clark NC, Hill BC, OHara CM, et al. Epidemiologic typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks. Diagn Microbiol Infect Dis 1990; 13; 467-72.

Archive of SID

www.SID.ir

21.Van Acker J, De Smet F, Muyldermans G, et al. outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. J Clin Microbiol 2001; 39: 293-7.
22.CDC Morbidity and Mortality Weekly Report. April 12, 2002/Vol. 51/No. 14.
23.International Commission on Microbiological Specifications for foods, R. Bruce Tompkin, edithor. Microorganisms in foods 7: Microbiological testing in food safety management. New York: Springer US: 2002.
24.Caubilla-barron J, Hurrell E, Townsend S, et al. Genotypic and Phenotypic Analysis of *Enterobacter sakazakii* Strains from an Outbreak Resulting in Fatalities in Neonatal Intensive Care Unit in France. J Clin Microbiol 2007; 45: 3979-85.
25.Abbas pour S, Mardaneh J, Ahmadi K. The survey of shigellosis frequency and determination of antibiotic resistance profile of isolated strains from infected children in Tehran. ISMJ 2014; 17: 42-8.
26.Mardaneh J, Ahmadi K, Jahan Sepas A. Determination antimicrobial resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients in Taleghani Hospital (Ahvaz, Iran) from 2011-2012. JFUMS 2013; 3: 188-93.
27.Abbas Poor Sh, Mardaneh J, Dehbashi S, et al. Profile of antimicrobial susceptibility isolated microorganisms from hospitalized patients in PICU ward and detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and ESBLproducing bacteria by phenotypic methods. ISMJ. In Press 2013.

Archive of SID

www.SID.ir

ISMJ 2014; 17(3): 272-279

Orginal Article

Detection of *Enterobacter sakazakii* in neonatal sepsis by PCR on 16S ribosomal RNA

Kh. Ahmadi [1], A. Farajzadeh Sheikh [1*], J. Mardaneh [2], F. Modarresi [3], S. Shoja [1]

[1] Department of Microbiology, Medical School, Ahvaz University of Medical Sciences, Ahvaz, IRAN.
[2] Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Nemazee Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, IRAN.
[3] Department of Microbiology, Medical School, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, IRAN.

(Received 18 May, 2012 Accepted 5 Sep, 2012)

Abstract

Background: *Enterobacter sakazakii* is a gram negative, facultative anaerobic, straight rod-shaped bacterium that belongs to the family Enterobacteriaceae. It is also considered an emerging opportunistic pathogen, responsible of cases of neonatal infections including sepsis, meningitis, necrotizing enterocolitis ad bacteremia. The goal of this study was detection of *Enterobacter salazakii* in neonates with sepsis by PCR on 16S ribosomal RNA gene.

Material and Methods: This cross-sectional study was conducted on 405 blood specimens that were taken from hospitalized neonates suspected to sepsis in Ahvaz Abuzar Hospital in 2011. From each neonate 0.5 ml blood sample was taken and placed in CBC tubes containing EDTA at -20^{0}C for polymerase chain reaction. For detection of *Enterobacter sakazakii*, PCR was performed on DNA for amplification of 16S ribosomal RNA gene.

Results: In all 405 neonates blood samples' PCR reactions for *Enterobacter sakazakii* 16S ribosomal RNA gene were negative. Blood cultures were positive for *Streptococcus agalactiae* in 8 (1.4 %) patients.

Conclusion: Because *Enterobacter sakazakii* is an opportunistic pathogen with high pathogenicity power, more investigation on high risk groups is required. For detection of infection caused by this organism using of different diagnostic methods with high specificity and sensitivity is necessary.

Key words: *Enterobacter sakazakii*, neonate, sepsis, PCR.

**Address for correspondence:* Department of Microbiology, Medical School, Ahvaz University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
E-mail: farajzadehah@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir