التصنيف العددي لسلالات النوع *Rhodococcus equi*

باسمة احمد عبد الله ، اسراء غانم السماك ، هيام عادل الطائي

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

(تاريخ الاستلام: ١٥ / ٦ /٢٠٠٨ ، تاريخ القبول: ١٠ / ٣ / ٢٠٠٩)

الملخص

استلمت(٥٠) مزرعة بكتيرية تابعة لجنس *Rhodococcus* spp. معزولة ونقية من الانف والاذن والحنجرة والقشع لاشخاص مصابين بالتهابات رئوية ومشخصين من قبل الطبيب الاختصاص وكذلك من التربة.خضعت الصفات الشكلية والفسلجية والكيموحيوية وكذلك الحساسية لمضادات حيوية منتخبة للتصنيف العددي بالتحليل العنقودي وباستخدام الربط بالمعدل average وتطبيق معامل التشابه البسيط Simple matching coefficient (Ssm).

اوضحت النتائج ان (٣٤) عزلة هي تابعة للنوع *Rh. equi* حيث توزعت السلالات على عنقودين رئيسين A و B بالتساوي وبواقع (١٥) سلالة لكل منهما وفصلت اربعة سلالات فقط في عنقود منفصل C نتيجة للاختلاف في الحساسية للمضادات الحيوية المنتخبة قيد الدراسة على الاغلب .

المقدمة

تعود افراد جنس *Rhodococcus* حالياً الى شعبة Actinobacteria ، صنف Actinobacteria ، تحت صنف Actinobacteridae ، رتبة Actinomycetales ، تحت الرتبة Corynebacterineae وعائلة Nocardiaceae [2,1].

نسبت افرادها سابقاً لجنس *Nocardia* ولوحظ انها تقع بين جنسي *Nocardia* و *Mycobacterium* ، افرادها هوائية ، غير متحركة ، موجبة لصبغة كرام ، قد تصطبغ جزئياً بالصبغة المقاومة للحامض لانتمائها للمجموعة التي تمتلك حامض المايكولك في جدارها ، قد تظهر تغايراً في شكل الخلايا من العصوي الى الكروي Rod-coccus cycle او تكون خيوط متفرعة سرعان ما تتكسر الى وحدات غير منتظمة الشكل ، مستعمراتها خشنة ، ناعمة او مخاطية بالوان مختلفة [4,3].

تلعب هذه البكتريا دور مهم في البيئة لامتلاكها مدى واسع من الانزيمات المحللة للمواد البلاستيكية المصنعة والملوثة للبيئة وتحويل او اعادة تصنيع مركبات مهمة في الصناعة اضافة لامراضيتها للانسان والحيوان والنبات ، اعيد تصنيف افرادها مرات عديدة ولازال [23,5] .

ان تطبيق التصنيف الكيميائي والمظهري العددي والجزيئي وسيلة مهمة لتوضيح العلاقة ضمن افراد جنس *Rhodococcus* والاجناس القريبة منه ، وان العديد منها سلكت طريق تطوري اعتماداً على دراسة تتابع جزء 16s rDNA ويمكن تمييزها عن بعضها باستخدام الصفات الكيموحيوية والشكلية والفسلجية ، وان الدراسات المظهرية والجينية المستفيضة ادت الى توفير اطار تصنيفي ثابت يؤدي الى تشخيص انواع جديدة ذات اهمية صناعية واقتصادية ومن المهم تثبيت الانواع الاكثر تواجداً في البيئة خاصة التربة لتحديد دورها في اعادة المغذيات والطاقة في البيئة [6] .

سجلت أول إصابة بخراجات الرئة للنوع *Rhodococcus equi* عام ١٩٦٧ وازدادت الحالات مع ظهور امراض الايدز والسرطان ، تحصل الاصابة عن طريق استنشاق البكتريا إذ تتواجد بنسبة ٥٠-٩٥ % من ترب المزارع واكثرها تركيزاً في فضلات الخيول وهي من الجراثيم المستعمرة لانف البالغين الاصحاء وتعد من عوامل انتشارها ولاتستعمر القناة الهضمية ، كما سجلت حالات ناتجة عن عدوى المستشفيات ، كما تسبب اضافة لالتهاب الرئة خراجات والتهابات في اعضاء الجسم المختلفة [7] ، فضلاً عن تسببها بتلوث الجروح والجهاز الهضمي والاغشية المخاطية [9,8] .

يسبب النوع *Rh. equi* التهاب الرئة والقنوات اللمفاوية lymphadenitis والقناة الهضمية enteritis للمهور في الاعمار أقل من ستة اشهر وتعد من المسببات الرئيسة لالتهاب وخراجات الرئة لمربي المهور والمثبطن مناعياً وهي بهذا تشابه الاصابة بالسل الرئوي ، اعتبرت في السابق ملوثة للعينات بسبب انتشارها الواسع في البيئة وحديثاً أثبتت امراضيتها الانتهازية والتي تعود خاصة لامتلاكها لبلازميد كبير للضراوة بحجم 85-90 kb [12,11,10].

يسبب افرادها وفيات عالية للمهور ولايتوفر لقاح لها وعليه فهناك حاجة لايجاد طرق للسيطرة على هذا المرض وان المعلومات المتوفرة عن آليات الانتقال والاصابة غير واضحة بشكل كبير [13].

تتواجد عادة في التربة ومعدة آكلات الاعشاب والابقار والاحصنة والاغنام والخنازير [14] ، تعد من الممرضات الداخل خلوية اختيارياً في كل من العدلات والبلاعم [17,16,15] ان تحديد صفات النوع *Rh. equi* له دور في تشخيصها في الحالات الوبائية [18].

بسبب اعتبار الافراد التابعة لجنس *Rhodococcus* من الملوثات الانتهازية خاصة النوع *Rh. equi* والتشخيص الخاطئ باعتبارها diphtheroids الطبيعية التواجد ولظهور افراده بشكل عصيات تصطبغ بالصبغة المقاومة للحامض وتشخص خطأ على انها *Mycobacterium tuberculosis* او غيرها من البكتريا الخيطية مما يؤدي الى تناول العلاج الخاطئ اضافة الى اهميتها من الناحية الصناعية والاقتصادية ارتأت الدراسة عزلها من مصادرها المختلفة وتصنيفها عددياً لاقتراح جدول تشخيصي وتصنيفي ثابت ومقبول للسلالات المعزولة خاصة من البيئة المحلية لمدينة الموصل.

المواد وطرائق العمل

انتخبت (٥٠) عزلة من عزلات الطائي [19] والمنسبة اعتماداً على الصفات المظهرية بعائديتها لجنس *Rhodococcus*. اعيد تأكيد تشخيصها باستخدام الصفات الشكلية والكيموحيوية والفسلجية وحساسيتها للمضادات الحيوية وتم الحصول على (٣٤) عزلة تابعة للنوع *Rh. equi* والمعزولة من عينات الانف والاذن والحنجرة والقشع لاشخاص لديهم اصابات رئوية مشخصة من قبل الطبيب المختص اضافة لعزلات من التربة [23,22,21,20,19,3] .

وبتطبيق خطوات التصنيف العددي باستخدام معامل التشابه البسيط Simple matching coefficient (Ssm) والربط بالمعدل الموزون weighted average باستخدام النظام الاحصائي spss بعد تشفير البيانات بنظام الارقام الثنائية (١ ، ٠) وتكوين مصفوفة البيانات المؤلفة

النتائج والمناقشة

تم انتقاء ٣٤ عزلة تابعة للنوع *Rh. equi* المعزولة من الانسان والتربة ، حيث انها تعزل من مصادر متعددة منها الانسان والحيوان والنبات والتربة [28]، حيث عزلت من قبل الباحث [4] عام ١٩٨٩ من حالات التهاب الرئة كما في الدراسة الحالية.

اعتمدت الصفات الشكلية للمستعمرات والخلايا في العزل الاولي للمستعمرات التابعة لهذا النوع خاصة دورة النمو أي تكوين الخيوط عند تنمية البكتريا في الوسط السائل لمدة ٢-٣ يوم ، ثم أكملت الاختبارات التشخيصية الشكلية والكيموحيوية والفسلجية وحساسيتها للمضادات الحيوية لتصنيفها عددياً وتم الحصول على ثلاثة عناقيد رئيسة C,B,A ضمن المخطط الهرمي الشجري لسلالات تابعة للنوع *Rh. equi* عند مستويات تشابه مختلفة وكما موضح في الشكل والجدول (١).

الجدول ١ : رموز العناقيد الرئيسة والنسب المئوية للتشابه ضمن المخطط الشجري للسلالات التابعة للنوع *Rhodococcus equi*

رموز العناقيد	النوع	النسب المئوية للتشابه %
A	*Rhodococcus equi*	80
B	*Rhodococcus equi*	80
C	*Rhodococcus equi*	75

أظهرت أغلب السلالات اختلافاً في اشكالها من الكروي الى الخيطي والذي يعود الى اختلاف فترة النمو او نوع الوسط ، أظهرت اغلبها مستعمرات مخاطية منتشرة بلون السالمون البرتقالي وهذا مشابه لما حصلت عليه [23].

كما اتفقت نتائجنا مع دراسة التصنيف العددي للباحث [29] من حيث صفات البكتريا وان اغلب السلالات عادت للنوع *Rh. equi* وأغلبها كانت معزولة من التربة وبعضها من حالات مرضية .

أظهرت كل السلالات نتائج موجبة للكتاليز وتحليل الدهون والفوسفاتيز القاعدي وسالبة للهبيوريت والكلوكوز وهذه الصفات لم تدخل ضمن العملية التصنيفية حيث عندما تكون كل العزلات سالبة او موجبة لاختبار معين من عدد (m=74) من الصفات بواقع (٤٨) صفة حيث ادخلت اغلب الصفات في أكثر من حقل لعدد العزلات (n=34) وان ستة من الاختبارات والتي ظهرت موجبة او سالبة لكل العزلات لم تدخل ضمن العملية التصنيفية [27,26,25,24,22] .

لاتؤثر الصفات في العملية التصنيفية ولكنها تعد صفات مهمة لتشخيص النوع او السلالة ثبتت من خلال دراستنا ودراسة [19].

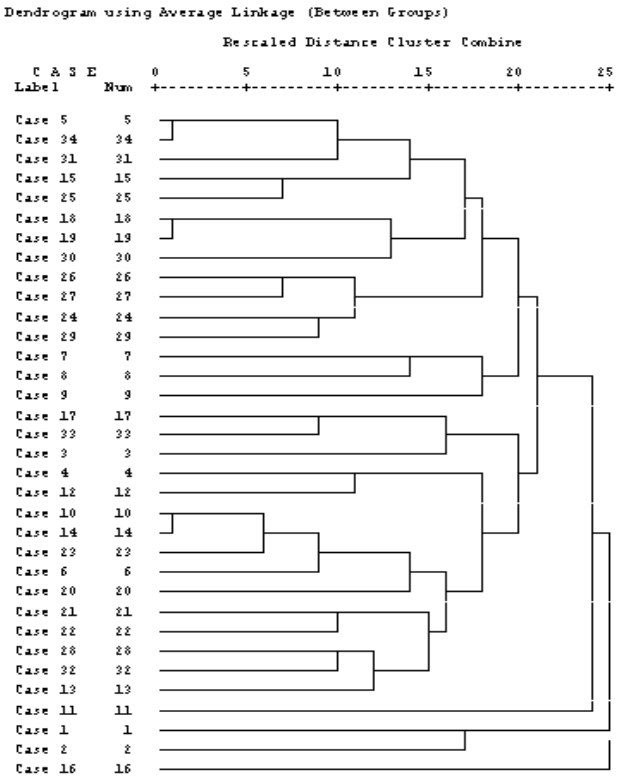
أظهرت أغلب السلالات نتائج موجبة للكلاكتوز واختزال النترات وأغلبها سالبة للاوكسديز والجلاتين والاسكولين وحساسية مختلفة للمضادات الحيوية وكما موضح في الجدول (٢) وهي مشابهة لما توصل اليه الباحثين [31,30,22] .

تم تمييز سلالات النوع *Rh. equi* بكونها غير محللة لدم الاغنام مخاطية غير منتظمة ومنتشرة في الطبق واحياناً تقطر وتؤدي الى التصاق غلاف الطبق وهو مطابق لدراسة الباحث [21] . اعتماداً على دراسة تتابع جزء 16s rDNA ، وقع النوع *Rh. equi* في عنقود منفصل عن انواع الجنس الاخرى [6] . وان نتائج العملية التصنيفية مماثلة في صفاتها لما ورد في [22,20,3] حيث اتصفت السلالات بعدم قدرتها على تخمير مدى واسع من السكريات مما يميزها عن الاجناس القريبة منها الشبيهة بالكورايني coryneform والشبيهة بالنوكارديا Nocardioform.

كما أمكن تمييزها عن جنس Nocardia من خلال قابليتها على إنتاج الحامض من المانوز واختزال النترات واستهلاك السكروز اضافة الى اختلاف شكل المستعمرة [32].

النسب المئوية للتشابه

رقم العزلة



المخطط الشجري لسلالات النوع *Rhodococcus equi* باستخدام معامل التشابه البسيط والربط بالمعدل الموزون

الجدول ٢ : العناقيد التي تم الحصول عليها من المخطط الشجري والنسب المئوية لاظهار الصفات

C	B	A	رمز العنقود / الصفات	
4	15	15	عدد العزلات	
النسب المئوية للصفات				
25	73.3	73.3	كروية	شكل الخلايا في الوسط الصلب
25	0	6.7	عصوية	
25	13.3	0	عصوية قصيرة	
25	13.3	20.0	خيطية	
100	73.3	60.0	مخاطية	القوام
0	26.7	40.0	خشنة	
50	73.3	46.7	سالمون برتقالي	الوان المستعمرات
0	6.7	33.3	سالمون وردي	
25	6.7	13.3	برتقالي	
25	0	0	حمراء	
0	13.3	6.7	باهتة	
25	20.0	6.7	مانيتول	استهلاك السكريات
25	33.3	20.0	مانوز	
25	13.3	6.7	سكروز	
25	33.3	6.7	رافينوز	
100	93.3	100	كلاكتوز	
50	13.3	6.7	اوكسديز	
100	73.3	86.7	اختزال النترات	
25	26.7	6.7	تحليل الجلاتين	
50	26.7	13.3	الاسكولين	
50	6.7	6.7	انتاج الاندول	
50	13.3	0	انتاج غاز H_2S	
50m	0	6.7m	Amoxicillin 30µg	حساسيتها للمضادات الحيوية
25	6.7	0	Cloxicillin 5µg	
25	6.7	20	Fluoxicillin 30 µg	
0	13.3	0	Amikacin 30µg	
0	53.3/13.3 m	26.7/6.7 m	Clindamycin 2µg	
25/25m	53.3/26.7 m	60/20 m	Neomycin 30µg	
50	13.3/20 m	40/20 m	Nalidixic acid 30µg	
50	13.3/13.3 m	60/20 m	Roxithromycin 15µg	
75/25m	6.7/60 m	13.3/40 m	Peofloxacin 5µg	
75	26.7/6.7m	73.3	Gentamicin 10µg	
0	0	0	Cefotaxime 30µg	
50	66.7	93.3	Vancomycin 30µg	
75	33.3	66.7	Tobromycin 10µg	
25	0	20/6.7m	Sulfamethoxazole 5µg	
50	20/6.7m	53.3/6.7m	Tetracycline 30µg	
75	26.7/6.7m	100	Doxycycline 30µg	
75	6.7	40/13.3m	Sulfanamide 300µg	
0	0	0	Cephalothin 30µg	
25/25m	13.3/20m	53.3/6.7m	Chloramphenicol 30µg	
75	66.7/13.3m	60/33.3m	Amoxicillin – Clavulanic acid 30µg	
25	33.3m	26.7m	Erythromycin 15µg	
50	26.7	73.3	Rifampin 30 µg	
50	20m	46.7/13.3m	Lincomycin 30µg	
25	6.7	6.7/13.3m	Trimethoprim 5µg	
75	13.3/20m	60	Ciprofloxacin 5µg	
0	0	13.3m	Pencillin G 10µg	

0 %: سالبة للاختبار ومقاومة للمضاد 100 % : موجبة للاختبار وحساسة للمضاد m : متوسطة الحساسية للمضاد الحيوي

المصادر

1. Garrity, G.M.; Bell, J.A. and Lilburn, T.G. (2004). Taxonomic outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. Springer New York , Inc. U.S.A., pp. 1-401.
2. Boone, D.E.; Castenholz, R.W. and Garrity, G.M. (2001). Bergey's Manual of systematic Bacteriology. The archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria. 2nd ed. Vol. 1. springer-verlay, New York, Inc. U.S.A. , pp. 21-166.
3. Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins. Baltimore., pp. 605-703.
4. Osoagbaka, O.U. (1989). Evidence for the pathogenic role of *Rhodococcus* species in pulmonary diseases. J. Appl. Bacteriol. 66 : 497-506.
5. Bell, K.S.; Philp, J.C.; Aw, D.W.J. and Christofi, N. (1998). The genus *Rhodococcus*. J. Appl. Microbiol. 85, 195-210.
6. Zhang, J.; Zhang, Y.; Xiao, C.; Liu, Z. and Goodfellow, M. (2002). *Rhodococcus maanshanensis* sp. nov., anovel actinomycete from soil. Inter. J. Syst. Evol. Microbiol., 52 , 2121-2126.
7. Neinstock, D.M. and Brown, A. (2002). *Rhodococcus equi*: An emerging pathogen. Clin. Infect. Dis., 34 : 1379-85.
8. Hondalus, M.K. (1997). Pathogensis and virulence of *Rhodococcus equi*. Vet. Microbiol., 56 (3-4): 257-268.
9. Takai, S.; Madarame, H.; Matsumoto, C.; Inoue, M.; Sasaki , Y.; Hasegawa, Y.; Tsubaki, S. and Nakane, A. (1995). Pathogenesis of *Rhodococcus equi* infection in mice: Roles of virulence plastids and granulomagenic activity of bacteria. Immun. Med. Microbiol., 11 (3) : 181-190.
10. Takai, S.; Tharavichtkui, P.; Sasaki, Y.; Onishi, Y.; Yamano, S.; Kakuda, T.; Tsubaki, S.; Trinarong, C.; Rojanasthien, S.; Sirimalaisuwan, A.; Tesaprateep, T.; Maneekarn, N. and Kirikae, T. (2002). Identification of virulence – associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with a quired immune deficiency syndrome and prevalence of virulent *Rh. equi* in soil collected from domestic animal farms in Chiang Mai Thailand. Am. J. Trop. Med. Hyg., 66 (1) : 52-55.
11. Takai, S.; Sasaki, Y.; Ikeda, T.; Uchida, Y.; Tsubaki , S. and Sekizaki, T. (1994). Virulence of *Rhodococcus equi* isolates from patients with and without AIDS. J. Clin. Microbiol., 32 (2): 457-460.
12. De Lapena - Moctezuma, A.; Prescott, J.F. and Goodfellow, M. (1996). Attempts to find phenotypic markers of the virulence plasmid of *Rhodococcus equi*. Can. J. Vet. Res., 60 : 29-33.
13. Cohen, N.D.; Smith, K.E.; Ficht, T.A.; Takai, S.; Libal, M.C.; Becu, T., Leadon, D.P.; Chaffin, M.K. and Martens, R.J. (2003). Genetic variability Among isolates of *Rhodococcus equi* obtained from horses and horse farms: Clinical Implications American Association of Equine Practitioners.,1-7.
14. Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (1986). Bergey's manual of systematic Bacteriology. Vol. 2. Williams and Wilkins Baltimore. Waverly press, Inc., pp. 1458-1506.
15. Kohler, A.K.; Stone, D.M.; Hines, M.T.; Byrne, B.A.; Alperin , D.C.; Norton, L.K. and Hines, S.A. (2003). *Rhodococcus equi* secreted antigens are immunogenic and stimulate a type 1 recall response in the lungs of Horses immune to *Rh. equi* infection. Infection and Immunity, 71 (11) : 6329-6337.
16. Garton, N.J.; Gillerons, M.; Brando, T.; Hong Dan, H.; Giguere, S.; Puzo, G.; Prescott, J.F. and Sutcliffe, I. (2002). A novel lipoarabinomannan from the equine pathogen *Rhodococcus equi*. J. Biological chemistry. 277 (35) , 31722-31733.
17. Nordmann, P.; Keller, M.; Espinasse, F. and Ronco, E. (1994). Correlation between antibiotic resistance , phage – like particle presence, and virulence in *Rhodococcus equi* human isolates. J. Clin. Microbiol., 32 (2) : 377-383.
18. Kulich, S.M. and Pasculle, W.A. (2001). Final diagnosis pneumonia, hilar lymphadenitis and sepsis secondary to *Rhodococcus equi*. Infect. Dis., 146 : 1-3.

١٩. الطائي، هيام عادل ابراهيم (٢٠٠٥). عزل جرثومة *Rhodococcus equi* من الجهاز التنفسي لمرضى الحساسية في محافظة نينوى . اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة الموصل.

20. Koneman, E.M.; Allen, S.D.; Dowell, V.R.; Janda, W.M.; Sommer, H.M. and Winn, W.C. (1997). Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. 4th ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia.
21. Yoo, S.J.; Sung, H.; Chae, J.D.; Kim, M.N.; Pai, C.H.; Park, J. and Kim, J.J. (2003). *Rhodococcus equi* pneumonia in a heart transplant recipient in Korea, with emphasis on microbial diagnosis. Clin. Microbiol. Infect. 9 : 230-233.
22. Bermejo, I.G. (2003). *Rhodococcus equi* : Aspectos Microbiologicosy Clinicos. Control calidad.

٢٣. السماك ، اسراء غانم (٢٠٠٦). دراسة تصنيفية لمجموعة البكتريا الخيطية. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم ، جامعة الموصل.

٢٤. عبد الله ، باسمة احمد (١٩٩٦). التصنيف العددي بالتحليل العنقودي لجراثيم اشباه القولونيات. اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة الموصل.

25. Sackin, M.J. and Jones, D. (1993). Handbook of new Bacterial systematics. Academic press, Ltd., pp. 281-313.
26. Prescott, L.M.; Harley, J.P and Klein , D.A. (2005). Microbiology, 6th ed. MC Graw. Hill companies Inc., New York. pp. 409-416.

٢٧. السماك ، اسراء غانم (١٩٩٨). التصنيف المظهري لانواع جنس العصيات باستخدام التحليل العددي . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الموصل.

28. Broughton, R.A.; Wilson, H.D.; Goodman, N.L. and Hedrick, J.A. (1981). Septic Arthritis and osteomyelitis caused by an organism of the genus *Rhodococcus*. J. Clin. Microbiol. 13 (1) : 209-213.
29. Goodfellow, M.; Beckham, A.R. and Barton, M.D. (1982). Numerical classification of *Rhodococcus equi* and related actinomycetes. J. Appl. Bacteriol. 53, 199-207.
30. Jacks, S.S.; Giguere, S. and Nauyen, A.N., (2003). In vitro susceptibilities of *Rhodococcus equi* and other common equine pathogens to Azithromycin, Clarithromycin, and 20 other antimicrobials, A. A. C. , 47 (5) : 1742-1745.
31. Kwak, E.J.; Strollo, D.C.; Kutich, S.M. and Kusne, S. (2003). Cavitary pneumonia due to *Rhodococcus equi* in a heart transplant recipient. Transpl. Infect. Dis., 5 : 43-46.
32. Forbes, B.A.; Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. (2002). Baile and Scott's Diagnostic Microbiology. 9th ed. Vol. 1 Mosby, Inc, U.S.A. , pp. 285-363.

Numerical classification of *Rhodococcus equi* strains

Bassima A. Abdulla , Essra G.Al-Sammak , Hiyam A. Al-Taei
Department of Biology , College of Science , Mosul University , Mosul , Iraq
(Received 15 / 6 / 2008 , Accepted 10 / 3 / 2009)

Abstract

Fifteen isolates received as *Rhodococcus* spp. marker as pure culture from nose, ear, throat & sputum of patients infected with pneumonia depending on clinical symptoms observed by specialist physicians , and also from soil.

Classification was based upon the morphological, biochemical, ecological, environmental and sensitivity to selected antibiotics characteristics using conventional numerical taxonomy, cluster analysis and average linkage method. The similarity level between strains were determined and compared using simple matching coefficient Ssm.

The results indicated that (34) isolates are belongs to species *Rh. equi* and were differentiated into three main clusters within the hierachical dendrogram. The cluster A and B include 15 strains for each of them & the remaining four strain divided into clusler C due to difference in sensitivity to selective antibiotics.