*دراسة جزيئية لأنواع جرثومة*Aeromonas*المعزولة من عينات سريريه وبيئية

تاريخ الاستلام : 2014/4/7 تاريخ القبول : 2015/6/9

صفاء منعم سلمان و أزهار نوري حسين
جامعة القادسية / كلية التربية / قسم علوم الحياة

safaaa.munim@yahoo.com

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة جمع 259 عينة توزعت على 233 عينـة من مصادر سريرية مختلفة للمرضى الراقدين في مستشفيات مدينة الديوانية , و 26 عينـة بيئيـة مائية مختلفة. بينت نتائج الاختبارات المظهرية والكيموحيوية والعدة التشخيصية API 20 E وجهاز الفايتكVitek system بالأضافة إلى أستخدام تقنية تفاعل سلسلة البوليميريز Polymerase Chain Reaction (PCR) لتشخيص جرثومةأيروموناس *Aeromonas*spp. جزيئياً باستخدام المورث *16S rDNA* عائديه 17 عزلة بكتيريةلجنس *Aeromonas*spp. على مستوى النوع شخصت 8عزلات تعود للنوع *A. hydrophila* , و 4عزلات للنوع *A.sobria*,و 4عزلات للنوع *A.caviae* , وعزلة واحدة للنوع *A.salmonicida* , كما استخدمت تقنية PCR للتحري عن وجود بعض عوامل الضراوة كالمورثات المسؤولـــــة عن إنتـــاج الذيفانات الخارجيـــة وهيذيفانالهيمولايسين(Hemolysin (hly A والأيرولايسين(Aerolysin(aer A والذيفانات المعوية المحللة للخلايا Cytolytic enterotoxin (aer) , كما ظهر أن 77.7 % و 62.5 % من العزلات البيئية والسريرية على التوالي امتلكت المورث *hly A* بينما كانت نسب وجود مورث *aer A* في هذه العزلات نفسها 44.4% و 50 % على التوالي , وفيما يخص المورث *aer* فقد وجد فقط في العزلات السريرية وبنسبـــــة25 % فيما لم يتم تسجيل أي وجود له في العزلات البيئية .فيما يخص مورثات المقاومة لمضادات البيتالاكتامβ-lactam والمتمثلة بـإنزيمات البيتالاكتاميزβ-lactamases مثل bla_{CMY} , bla_{TEM} , bla_{CTX-M}وbla_{SHV}المستخدمة في هذه الدراسة حيث أظهرت النتائج أمتلاك11.76 % للمورث bla_{CMY} و 5.88 % للمورث bla_{TEM} و 17.64 % للمورثbla_{CTX-M}فيما لم يتم تسجيل وجود للمورث bla_{SHV} في أي من العزلات البيئية أو السريرية .

الكلمات المفتاحية Keywords:أيروموناس, أيرولايسين, هيمولايسين, الذيفان المعوي المحلل للخلايا .

MicrobiologyClassification QR1 – 74.5

*البحثمستلمنرسالةماجستيرللباحثالاول .

المقدمة Introduction

تنتشر أنواع *Aeromonas* بشكل واسع في الطبيعة ولا سيما في البيئات المائية كالأنهار والبحيرات ومياه الصرف الصحي ومياه الشرب الملوثة والمعالجة وكذلك التربة كما عزلت من منتجات غذائية كالأسماك واللحوم والحليب والخضروات الملوثة[1و2] مسببة بذلك العديد من الأمراض لمجموعة متنوعة من الأسماك والحيوانات من ذوات الدم الحار والبارد خصوصاً ذات العلاقة بالبيئة المائية [3و4], وقد تسبب أمراضاً معوية وغير

معوية والتي غالباً ما يكون بعضها مميتا [5]حيث أرتبط بعضها بحالات الإسهال الصيفي إذ تم عزلها من المرضى المصابين بحالات الأسهال الحاد وأخماجالبريتون و الشغافوتسمم الدم وخمج المفاصل والفشل الكلوي[6] .

إن أمراضيةجراثيم أيروموناس تعود إلى امتلاكها لعدد من عوامل الضراوة منها الذيفانات الخارجية كالذيفانات المحللة للدم كالهيمولايسين Hemolysin (hly)والايرولايسينAerolysin

(aerA)والذيفان المعوي المحلل للخلايا Cytolytic enterotoxin (aer) فضلاً عن قدرتها على إنتاج الذيفانات الداخلية والمحفظة وطبقة S-layer والأسواط والأنزيمات الخارجية الهاضمة للمكونات الخلوية , وهذه العوامل هي التي تُمكن الجرثومة من الدخول واستعمار الأنسجة وأحداث

الضرر فيها وتجنب دفاعات المضيف والانتشار وقتل المضيف في النهاية [7], فضلاً عن أمتلاكها أنماطاً من المقاومة للعديد من المضادات الحيوية كالقدرةعلى إنتاج العديد منانزيمات البيتالاكتاميزβ-Lactamase المشفرة بلازميدياً أو كروموسومياً مثل blaTEM, blaCMY, blaCTX-M وblaSHVمما يجعلها مقاومة لمضادات البنسلينياتPenicillinsوالسيفالوسبورينات Cephalosporinsوالكاربابنيم Carbapenims , وهذا يجعل علاج الأخماج الناتجة من هذه الجراثيم عملية صعبة الأمر الذي يزيد من خطورتها من الناحية السريرية[8]0

ونظراً لما تمثله هذه البكتريا من تهديد لصحة وحياة البشر بما تسببه من أمراض مختلفة في شدة الخطورة تتراوح من حالات الأسهال وصولاً إلى تليف الكبد والأورام الخبيثة وتسمم الدم فضلاً عن أمتلاكها آليات دفاعية خطيرة كالقدرة على أنتاج أنواع مختلفة

من السموم وأمتلاك بعض آليات المقاومة للمضادات الحيوية لذا فأن هذه الدراسة تهدف إلى التعرف إلى الآلية التي تُمكن جراثيم الـ *Aeromonas*من إحداث

الخمج ومقاومة المضادات الحيوية المستخدمة ضدها بالتعرف إلى المورثات المسؤولة عن أظهار هذه الصفات في هذه الجراثيم 0

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

جمع العينات وطريقة زرعها Samples Collection andCulture Methods

جمعت 259 عينة شملت 160عينة خروج من أطفال مصابين بالإسهال (مائي ودموي) تراوحت أعمارهم من يوم إلى ست سنوات من مستشفى الديوانية للنسائية والأطفال التعليمي , كما جمعت عينات أخرى من مستشفى الديوانية العام التعليمي , والتي تضمنت 35عينة إدرار من اشخاص مصابين بأخماج المسالك البولية , و 20 مسحة جروح و 18 مسحة حروق باستخدام ماسحات قطنية معقمة (Swaps)من أعمار مختلفة بالإضافة إلى 26 عينة ماء شملت 14 عينة من نهر الديوانية , 5 عينات من السواقي , عينتان من آبار إرتوازية , 5 عينات من ماء الحنفية للمدة من 10/11/2012 – 10/3/2013باستخدام أنابيب وحاويات بلاستيكية معقمة ونقلت العينات الى مختبر مستشفى الديوانية للنسائية والأطفال التعليمي لغرض

زرعها 0 لقحت العينات أولاً في وسط الأغناء (BDH, England)Alkaline Pepton Water (APW) وحضنت هوائياً عند درجة 37 مْ لمدة 24 ساعة , ثم أخذ ملء الناقل المعقم من المزارع النامية وزرع بطريقة التخطيط على وسط Thiosulfate-citrate-bile salts - sucrose agar (T.C.B.S) (Himedia , India), وحضنت الأطباق هوائياً عند درجة حرارة 37مْ لمدة 24ساعة , بعدها أخذت المستعمرات الصفراء وتم إعادة زرعها على وسط الماكونكي الصلب Macconkey agar (BDH, England) ووسط اساس الدم الصلب Blood base Agar(Biolife ,Italy) وحضنت الأطباق هوائياً عند درجة حرارة 37مْ لمدة 24ساعة[9] 0

عزل وتشخيصجرثومة أيروموناس:

شخصت جرثومة ايروموناس مبدئياً بأخذ جزء من مستعمرة واحدة نقية من كل نمو موجود على الأوساط الزرعية الخاصة بالزرع الأولي ودراسة الصفات الشكلية المتضمنة لون المستعمرة وحافاتها وارتفاعها ونوع التحلل التي أحدثته على وسط أساس الدم الصلب بالإضافة إلى صفات الخلايا تحت

المجهر الضوئي مثل لون الخلايا وشكلها وطريقة تجمعها بعد أن يتم تصبيغها بصبغة غرام وأجريت عليها عدد من الاختبارات الكيموحيوية والتي شملت اختبارات OxidaseCatalase ,indole ,Citrate utilization , methyl redVoges-proskauer ,Kligler Iron Agar (KIA) ,

بالإضافة إلى تخمير اللاكتوز باستخدام وسط MacConkey agar و تحلل الأسكولين وكذلك نوع التحلل (β or α) الذي تحدثه على وسط أكار الدم[9و10] . استخدمت العدة التشخيصية API 20 E (BioMerieux ,France) وكذلكجهاز الفايتك Vitek Compact 2[11] لتشخيص جرثومة ايروموناسبالأضافة إلى التشخيص بالإعتماد على المورث*16SrDNA*[12] والتي من خلالها شخصت العزلات بدقة أكبر0

أستخلاص الحامض النووي DNA:

أستخلص الحـــامض النووي DNAللعـــزلات قيـد الدراسة باستخدام عدة إستخلاص الدنا (Promiga, USA) , حيث لقح وسط نقيع القلب الدماغ السائل بمستعمرات نقية من العزلات المراد استخلاص الحـــامض النووي DNA لها , تم حضن العالق الجرثومي لكل عزلة لمدة24 ساعة وعند درجة حرارة 37 م , ومن ثم أخذ 1 مل من العالق الجرثومي الذي تم حضنه ووضع في أنبوبة ابندروف حجم 1.5 مل ثم أجريت عليه خطوات الأستخلاص وحسب تعليمات الشركة المجهزة.

تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل المفرد والمتعدد :

حضرمزيج تفاعل إنزيم البلمرة PCR PreMixالمفرد والمتعدد المضاف إليه كمية من PCR water و بـادئـات الـدنـاDNA primers وقالب الدنا DNA templateبحسب الجدول (1و 2) , بعد اكمال أضافة المكونات أغلقت أنابيب التفاعل ومزجت المكونات باستخـــدام المازج Vortex ثم نقلت إلـــى جهـــازالدورات الحراريةThermo cyclerلتفاعل إنزيم البلمرة لأجراء عملية تضخيم الـ DNAوأجريت عمليةبرمجة للجهاز وفق الظر وف الخاصة بكل بادئ Primer بحسب الجدول (3).

جدول (1) : مكونات وحجوم مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المفردPCR master mix Single

Volume	composition	
1.5µL	Forward primer	Primer
1.5µL	Reverse primer	
5 µL	DNA template	
12 µL	PCR water	
20 µL	Total Volume	

جدول(2) : مكونات وحجوم مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد Multiplex PCR master mix

Volume	composition	
1.5µL	Forward primer	Primer(1)
1.5µL	Reverse primer	
1.5µL	Forward primer	Primer(2)
1.5µL	Reverse primer	
5 µL	DNA template	
9 µL	PCR water	
20 µL	Total Volume	

جدول (3) :برنامج الدورات الحرارية لكل بادئ

	Temperature (°C)/Time	Target

Cycle No.	Final extension	Cycling condition			Initial denaturation	Gene
		extension	annealing	denaturation		
35	72×3 min	72×2 min	55×1 min	94×1 min	95×3 min	*16SrRNA*
35	72×7 min	72×1 min	55×1 min	95×1 min	94×5 min	*Hem*
35	72×7 min	72×2 min	52×30 sec	94×30 sec	94×5 min	*Aer*
35	72×7 min	72×2 min	62×30 sec	94×30 sec	94×5 min	*Hly*
35	72×5 min	72×1 min	50×1 min	95×30 sec	95×2 min	*SHV*
35	72×5 min	72×1 min	50×1 min	95×30 sec	95×2 min	*CTX-M*
35	72×5 min	72×1 min	50×1 min	95×30 sec	95×2 min	*CMY*
35	72×5 min	72×1 min	50×1 min	95×30 sec	95×2 min	*TEM*

الترحيل الكهربائي للدنا على هلام الاكاروز :

أتبعتطريقة[13] في عملية تحضير هلام الأكاروز بإذابة 0.8 - 1غم من مسحوق الأكاروز في100 مل من محلول دارئ TBEفي دورق زجاجي ومن ثم غلي المزيج , أضيف3مايكروليتر من صبغة بروميد الأثيديوم الى المزيج بعد ان تم تبريده إلى 50 مْ ومن ثم صب المزيج في قالب الأكاروز وترك ليتصلب . مزج 8مايكروليتر من الدنا لكل عزلة مع2مايكروليتر من دارئ التحميل لكل عزلة ووضع في حفرة من حفر الهلام , فحصت مواقع الحزم للدنا البلازميدي بواسطة باعث الأشعةفوقالبنفسجية (UV-Transilluminator)للتعرف على مواقع الحزم وحجومها ومقارنتها مع الدليل الحجمي DNA Ladder .

النتائج والمناقشة Results and Discussion

التشخيص و العزل Identification andIsolation

تم في هذه الدراسة الحصول على 9عزلات مصدرها المياه و 8عزلات من مصادر سريريه مختلفة اعتمادا على التشخيص المظهري والصفات الزرعيةوالكيموحيوية واستخدام العدة التشخيصية API 20 Eوجهاز الفايتك Vitek 2 Compact واستخدام المورث*16SrDNA* حيث لوحظ أن 8عزلات تعود للنوع *A.hydrophila* وعزلة واحدة تعود للنوع *A.salmonicida* و 4عزلات تعود للنوع *A.sobria*بالأضافة إلى 4عزلات تعود للنوع *A.caviae* , الجدول (4) .

الجدول (4) : عزلات بكتريا*Aeromonas* المعزولة من مصادر سريرية وبيئية حسب النوع ومصدر العزل

نوع العزلة				النسبة المئوية للعزل (%)	عدد العزلات	عدد العينات	العينة	
A.caviae	*A. sobria*	*A. salmonicida*	*A. hydrophila*					
1	2	1	2	42.8	6	14	شط الديوانية	بيئية
1	-	-	1	40	2	5	سواقي	
-	1	-	-	50	1	2	آبار ارتوازية	
-	-	-	-	-	-	5	مياه الحنفية	
2	3	1	3	34.6	9	26	المجموع الكلي للعينات والعزلات البيئية	
2	1	-	5	5	8	160	خروج	سريرية
-	-	-	-	-	-	35	إدرار	
-	-	-	-	-	-	20	جروح	
-	-	-	-	-	-	18	حروق	
2	1	-	5	3.43	8	233	المجموع الكلي للعينات والعزلات السريرية	
4	4	1	8	6.56	17	259	*المجموع الكلي*	

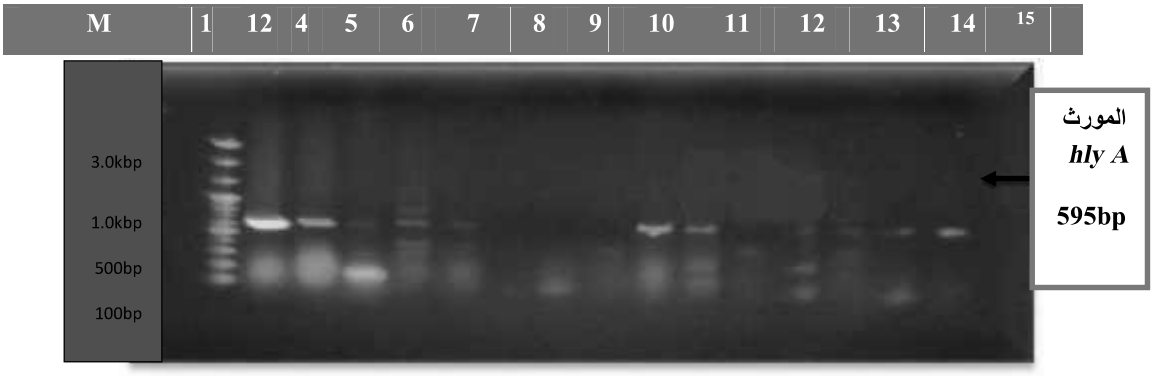
قيمة L.S.D = 1.464 . توجد فروق معنوية بين العزلات البيئية والسريرية عند مستوى 0.05

أن نسبة عزل جرثومة *Aeromonas*spp. في هذه الدراسة هي مشابهة لما توصل إليه بعض الباحثين , فعلى صعيد الدراسات المحلية فهي مشابهة لنسبة العزل التي توصلت إليها[14] من خلال دراسة أجرتها على أطفال مصابين بالأسهال والتي استطاعت من خلالها عزل هذه الجرثومة بنسبة 6.6 % , وكذلك[15] التي

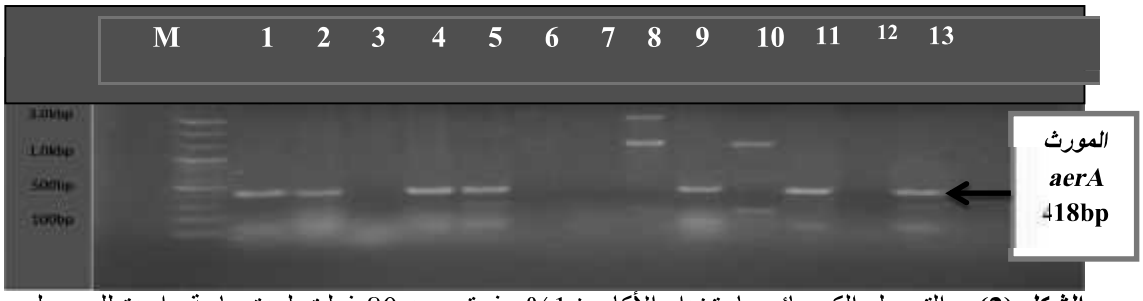
يتم في هذه الدراسة عزل جرثومة *Aeromonas*spp.من الجروح أو الحروق وهذا قد يعود إلى استخـــدام التعقيم الذي يقضي على عدد كبير من الجراثيم ومنهـــــا ايروموناس أو بسبـب قلة عدد العينـــات المجموعــة , كما لم يتم عزلها من الادرار وهذاقد يعود إلى بعض العوامل كانخفاض قيمة pH في الإدرار أو وجود بعض النواتج الأيضية السامة القاتلة لبعض الجراثيم .

التحري عن المورثات المسؤولة عن إنتاج بعض إنزيمات الضراوة(*aer A, aer,hly*): :

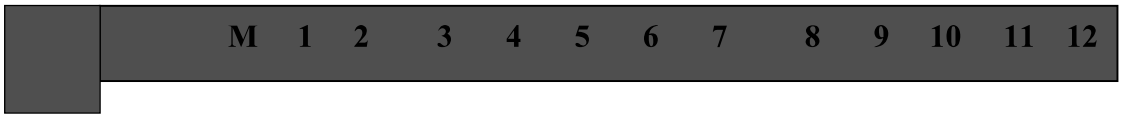
أظهرت نتائج استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المنفرد Monoplex PCRللتحري عن مورثات (*aer A , aer , hly*)فيعزلاتالأيروموناسوالموضحة في الاشكال (1و 2 و 3) , امتلاك 5عزلاتلحالات سريرية (أسهال) وبنسبة 62.5% لمورث *hly A*المسؤول مع المورث*aerA*عن تحليل الدم بينما أظهرت 7عزلات معزولة من المياه وبنسبة 77.7% امتلاكها لهذا المورث ,وهذا يماثل تقريباً ما توصلت إليه[16] والتي حصلت على نسبة 77.7 و 80% على التوالي تجاه وجود هذا المورث في عزلاتها البيئية والسريرية, كماأظهرت نتائج الدراسة الحالية أن 8عزلات(47.05%) من جرثومة ايروموناس المعزولة من المصادر البيئية والسريرية كانتتمتلك المورث*aerA* , منها 4/9عزلات(44.4 %) من مصادر بيئية (المياه) , اثنتان منها تعود للنوع *A.sobria*وواحدة لكل من *A.caviae and A.hydrophila*, أما بالنسبة للعزلات السريرية فقد أظهرت 4 من أصل 8عزلات وبنسبة 50 % امتلاكها لهذا المورث توزعت على 3عزلات تعــود للنــوع *A.hydrophila* وواحدة تعود للنوع *A.sobria*. فيما يخص المورث *aer*المسؤول عن إنتاج الذيفان المعوي فقد أظهرت النتائج أن عزلتين فقط معزولتان من برازطفلين مصابين بالأسهال تعودان للنوع *A.hydrophila*تمتلكان هذا المورث بينما لم تسجل الأنواع المعزولة من المياه أي نسبة عزل لهذا المورث.

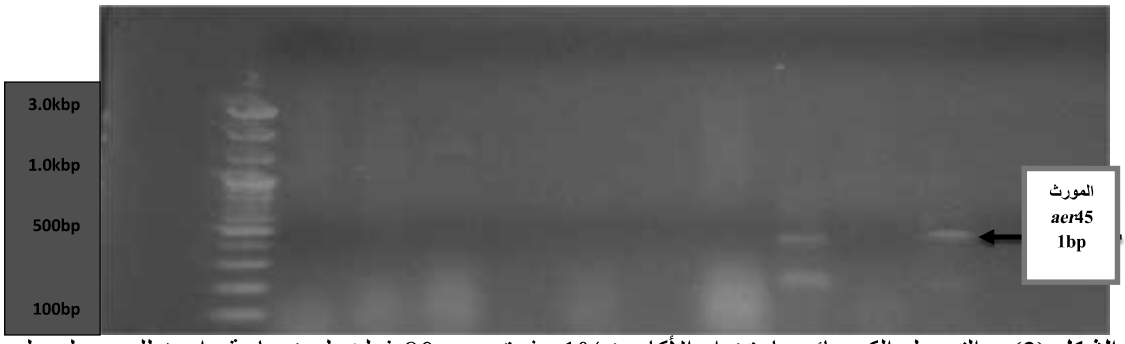


الشكل (1) :الترحيل الكهربائي باستخدام الأكاروز0.8% وفرق جهد 80 فولت لمدة ساعة واحدة للحصـول على نواتج تضخيم المورث*hly A*لجرثومة *Aeromonas*spp. M =DNA marker (bp 3000-100) المسارات 15 ,1 2 ,3 , 4 , 5 , 9 ,10 , 12 ,13 , 14 , تمتلك المورث*hly A* بينما المسارات 6 , 7 , 8 ,11لاتمتلك هذا المورث .



الشكل (2) : الترحيل الكهربائي باستخدام الأكاروز1% وفرق جهد 80 فولت لمدة ساعة واحدة للحصول على نواتج تضخيم المورث *aerA* لجرثومة (bp 3000-100) *Aeromonas*spp.M =DNA marker . المسارات 1 ,2 , 4 ,5 ,9 , 11 ,13 تمتلك المورث *aerA*بينما المسارات 3 , 6 ,7 ,8 ,10 ,12 ,14 ,15 فاقدة لهذا المورث.





الشكل (3) : الترحيل الكهربائي باستخدام الأكاروز1% وفرق جهد 80 فولت لمدة ساعة واحدة للحصول على نواتج تضخيم المورث *aer* لجرثومة *Aeromonas*spp. M =DNA marker(bp 3000-100). المساران 8 , 10 يمتلكان المورث *aer*أما بقية المسارات فهي فاقدة له .

أن مورثات *aerA* و*hlyA* يعتبران صفة موثوقة للتمييز بين الأنواع المرضية لجرثومة الأيروموناس , كما إن مورثات *aerA* و*hlyA* هما أكثر شيوعاً في النوع *A. hydrophila* من النوع *A. sobria* , وهذا يتفق مع ما ذكرته[16] بأن القدرة التحليلية للدم معروفة في الأنواع التابعةللـ *A. hydrophila* و*A.caviae* و*A. sobria*. أن هذين المورثين مختلفين عن بعضهما البعض وبشكل ملحوظ في مستوى الحوامض الأمينية . حيث وجد إن ذيفانالأيرولايسين الذي يشفر له المورث*aerA*يتألف من 463 حامض أميني وكتلته الجزيئية تساوي 53.8كيلودالتون أما بالنسبة لذيفانالهيمولايسين الذي يشفر له المورث *hlyA*فقد وجد إنه يتألف من577 حامض أميني وكتلته الجزيئية تساوي 63.7كيلودالتون في جرثومة*A.hydrophila* , بينما وجد إن هذا الذيفانفي جرثومة *A.salmonicida*يتألف من 578 حامض أميني مع كتلة جزيئية تساوي 64.4كيلودالتون .

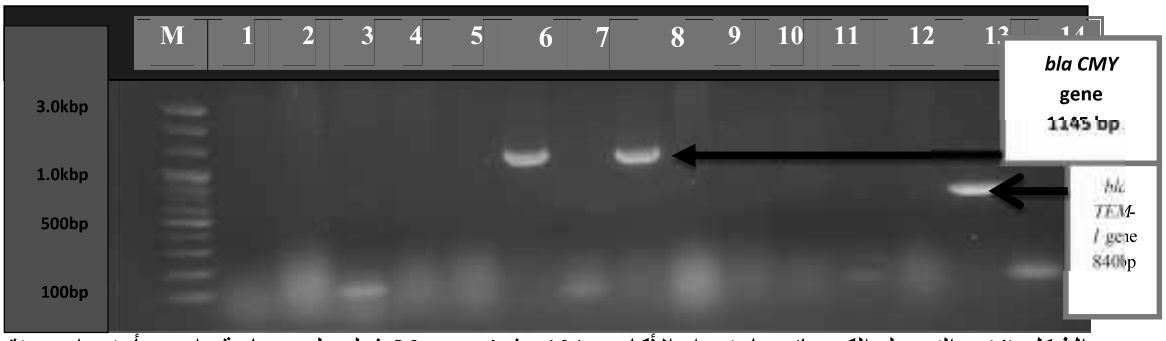
عند مقارنة نتائج تحليل الدم لجرثومة ايروموناس على وسط اساس الدم الصلب مع نتائج وجود مورثات الهيمولايسينوالأيرولايسين المسؤولة عن تحليل الدم في هذه الجرثومة نجد أن هناك أختلاف بين النتائج , لوحظ أن 12 عزلة وبنسبة 70.58 % أستطاعت أن تحلل الدم تحليلاً كاملاً (نوع بيتا) على وسط أساس الدم بينما نجد إن هناك 15 عزلة88.23%أمتلكت أما مورث*hlyA* أو جين *aerA* أو كلاهما وهذا قد يعود إلى أنه ليست جميع جراثيم ايروموناس قادرة على تحليل الدم تحليلاً كاملاً فقد تحلل الدم تحليلاً جزئيا من النوع ألفا.

إن ميكانيكية إفراز جرثومة ايروموناسلذيفاناتالهيمولايسينوالأيرولايسين عبر غشائها الخارجي بعد انتقالها عبر الغشاء الداخلي للجرثومة غير معروف تماماً فقد ذكر[17]بأن الهيمولايسينوالأيرولايسينمن الذيفانات المعروفة بتكوينها للثقوب في أغشية الخلايا المصابة والتي تم استخلاصها لأول مرة من النوع*A.hydrophila*ومن ثم استخلصت فيما بعد من النوع *A.sobria* , في حين ذكر[18] في دراسته التي أجراها على الذيفانات المحللة للدم و المفرزة من قبل جرثومة*V. cholera*أنه من المعتقد أن يتم انتقال هذه الذيفانات عن طريق ثقوب أو قنوات تصل ما بين الغشائين , نتيجة لملاحظته وجود قنوات مفردة تمر من خلالها هذه الذيفانات.

التحري عن المورثات المسؤولة عن إنتاج بعض إنزيمات البيتالاكتاميزالمقاومة للمضادات الحيوية :

استخدمت في هذه الدراسة تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المنفرد Monoplex PCR و تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المتعددMultiplex PCR للكشف عن مورثات إنتاج بعض إنزيمات البيتالاكتاميز في عزلات جرثومة ايروموناس قيد الدراسة والمسؤولة عن أحد أنماط المقاومة لمضادات البيتالاكتام من خلال استعمال قطع من DNA ذات عدد محدود من النيوكليوتايد (Oligonucleotid) تعمل كبادئات متخصصة لمورثات البيتالاكتاميز، التي شملت*blaTEM* و*blaCMY* و*blaCTX-M* و*blaSHV* كما استخدم الدنا الجرثومي الذي تم استخلاصه كقالب (Templet) جرت عليه عملية البلمرة . أظهرت النتائج بأستخدام تقنية تفاعلالبلمرة المتسلسل المتعدد Multiplex PCRالمستخدم للتحري عن ناتج تضخيم المورثين *blaCMY* و*blaTEM-1*, الشكل (4) ,

أمتلاك عزلتين من أصل 17 عزلة (11.76%) للجين*blaCMY*وهاتان العزلتان تعود إحداهما للنوع *A. hydrophila*و الأخرى تعود للنوع *A.caviae* وكلتاهما من العزلات السريرية البرازية في حين لم يتم الحصول على هذا المورث من العزلات البيئية , أما بالنسبة للمورث *blaTEM-1* فقد أظهرت النتائج إن عزلة واحدة فقط تمتلك هذا المورث وبنسبة عزل 5.88 % وهذه العزلة تعود للنوع *A.caviae* المعزولة من شط الديوانية في حين لم تسجل أي من العزلات السريرية وجود لهذا المورث . إن هذه النسبة مشابهة تقريباً لما توصل إليه [1920,] حيث حصل كل منهم على عزلة واحدة فقط وبنسبة عزل 4.76% .

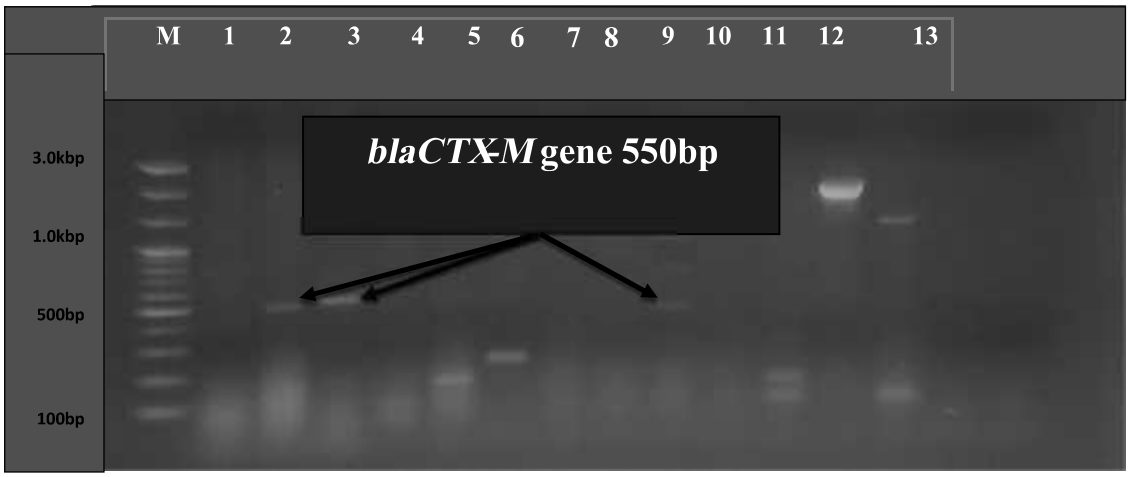


الشكل (4) : الترحيل الكهربائي باستخدام الأكاروز1% وفرق جهد 80 فولت لمدة ساعة واحدة بأستخدام تقنية Multiplex PCR للحصول على نواتج تضخيم المورث *blaCMY* و *blaTEM-1* لجرثومة *Aeromonas*spp. المساران 6 , 8 يمتلكان المورث*blaCMY* بينما كانت بقية المسارات فاقدة له بينما نجد ان المسار 14 يمتلك المورث*blaTEM-1* أما بقية المسارات 1-13 و 15 فهي فاقدة له .

لقد أشار بعض الباحثين ومنهم [19] إلى إمكانية أكتساب جرثومة ايروموناس لأنزيمات CMY من أنواع أخرى تعود لعائلة Enterobacteriaceae. أما بالنسبة لمورث *blaTEM-1* فقد ذكر[21و22] بأن الحاملة لهذا المورث تكون قادرة على الأنتقالمما سهل انتشار هذا المورث بين الأنواع الأخرى خلال سنوات قليلة بعد عزلها لأول مرة وهو الآن منتشر وبشكل واسع في جميع أنحاء العالم وفي مختلف الأنواع التابعة لعائلة Enterobacteriaceae مثل*E.coli*و*K.pneumonia*و*P. mirabilis* وحتى في الأنواعغيرالتابعة للـEnterobacteriaceae مثل *P.aeruginosa* و *Haemophilusinfluenzae* و *Nesseriagonorrhoeae*.

إن الانزيمات التي تشفر لها مورثات*blaTEM-1*و CMY تسمح بحدوث تحلل مائي للسيفالوسبوريناتوالبنسليناتوالازتريونام, فقد ذكر Bradford[23] أن أكثر من 90% من المقاومة ضد البنسلينات في جرثومة *E.coli*تحدث نتيجة إنتاج TEM-1 والـــذي يكون قادر على تحليل البنسلين وأوائل السيفالوسبوريناتبالأضافة إلى وجود أكثر من 170 نوع من مورثات *blaTEM* قادرة على مقاومة المثبطاتمثل clavulanic acidبواسطةتبدائلالحوامضالأمينية المفردة . لقدظهرأنالمستوياتالعاليةمن TEM-1تنتجالمقاومةضدPiperacillinوCephalothinو CefamandoleوCefoperazoneبينماالمستوياتالواطئةمنـــهتنتجمقاومةلمضادات Ampicillin , Amoxicillin and Ticarcillin[24و25].

استخدمت تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المنفرد Monoplex PCR للتحري عن ناتج تضخيم المورث *blaCTX-M* في هلام الأكاروز حيث أظهرت نتائج الدراسة الحالية امتلاك 3عزلات وبنسبة 17.64% للمورث *blaCTX-M* اثنتان منها بيئية أحداهما تعود للنوع *A.hydrophila*والأخرى تعود للنوع *A.sobria*أما العزلة الثالثة التي امتلكت هذا المورث فتعود للنوع *A.caviae* المعزول من مصادر سريرية , الشكل (5) , فيما لم تستطع دراسات أخرى من الحصول على هذا المورث من عزلات جرثومة ايروموناس ومنها دراســــة[19و26].



الشكل (5) :الترحيل الكهربائي باستخدام الأكاروز1% وفرق جهد 80 فولت لمدة ساعة واحدة للحصول على نواتج تضخيم المورث *blaCTX-M* لجرثومة (bp 3000-100) DNA marker= M.*Aeromonas*spp. المســــــارات 9,3,2 تمتلك المورث *blaCTX-M*أما بقية المسارات فهي فاقدة له .

أن المورث *blaCTX-M*أكتشف لأول مرة عام 1987 في عزلة تعود لجرثومة *K.pneumoniae* معزولة في فرنسا حيث وجد أنها تحوي بلازميــد يتوسـط المقاومــة لمضادات البيتالاكتام . إن هذه الأنزيمات التي تشفر لها هذه المورثات تُظهر درجة عالية من المقاومة لمضادات السيفوتاكسيم أكثر بكثير من فعاليتها ضد السيفتازيديم , وبسبب هذا النشاط العالي ضد cefotaxime سميت الانزيمات التي ينتجها هذا المورث بـ CTX . لقد ذكر Canton وجماعته[27] ان أنزيم CTX-M الذي ينتجه هذا المورث أكثر سيادة من إنزيماتTEMو SHVالمقاومة لمضادات البيتالاكتام والمُنتجة من الأنواع المرضية السالبة لصبغة غرام .

فيما يخص المورث *blaSHV* فلم تستطع الدراسة الحالية من أن تعطِ ناتج تضخيم لهذا المورث ولجميع عزلات جرثومة ايروموناسوهذه النتيجة تماثل ما توصل إليه Ramalivhana وجماعته [19] و Al-Ammar[20]حيث لم يسجلوا وجود له بين عزلاتهم . إن السبب في عدم اكتشاف هذا المورث في العزلات قيد الدراسة قد يعود إلى قلة عدد العزلات ، أو عدم امتلاك العزلاتللمورث المطلوب ، أو وجود أنواع أخرى لا تشكل هدفاً متخصصاً للمورث*blaSHV* الذي قد يكون متواجداً في تلك العزلات , كما أشار Canton وجماعته [27] إلى إن غياب هذه الانزيمات قد تكون مرتبطة بطريقة أنتقالها منالبيئة للمرضى.

تنتج جرثومة ايروموناس تشكيلة واسعة من الأنزيمات المقاومة لمجموعة مضادات البيتا لاكتام extended-spectrum ß-lactamases (ESBLs) وقد صنفت هذه المقاومة من قبلJanda و Abbott[28] إلى ثلاث فئات رئيسية هي الفئة ب المتمثلة بـ metallo-B-lactamases (MBL) والفئة ج المتمثلة بـ cephalosporinases والفئة د المتمثلة بـ penicillinases والتي يترتــب علــى وجودها آثاراً كبيرة وخصوصاً في الــدول الناميــة حيـث تكـون فــرص الحصــول علـى المضادات الحيوية محدودة . ان إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBLs) سائدة في السلالات المجتمعية وبشكل رئيسي في أفراد من العائلة المعوية Enterobacteriaceaeو إنّ إنتشار هذه الإنزيمات يصبح سهلاً بواسطة البلازميدات والعناصر المتنقلة وبما أن الأنواع البيئية لجرثومة أيروموناس عادة ما تحتوي على بلازميدات و أنتكرونات بالإضافــة إلــى عــدد مــن المورثات المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية لذا فمن الممكن أن تظهر هذه الجرثومة كمصدر للبلازميدات التي تسبب مقاومة مضادات quinolones[29و30].

References المصادر

1-**Belgin, E.** ; Ergin K. ; Elif c. and Kamil I. (2011). Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas*spp. isolated from food samples in Turkey. Turk. J. Biol ., 35 : 463-472.

2- **الطائي** , محمد ابراهيم نادر (2005) . دراسة كيموحيوية ومناعية لأنزيم البروتييز المنتج من العزلة المحلية لبكتريا *Aeromonashydrophila* . أطروحة دكتوراه – كلية العلوم – جامعة بغداد : 1- 112 .

3-**Martınez-Murcia,** A.J. ; Soler L. ; Saavedra M.J. ; Chacon M.R.andGuarro J. (2005). Phenotypic, genotypic and Phylogenetic discrepancies to differentiate *Aeromonassalmonicida*from*Aeromonasbestiarum*.Int. Microbiol., 8:259-269.

4-**Adam,** **K.** and Edyta K.(2005). Identification of *Aeromonasculicicola*by *16SrDNA* REFLP. Polish J. Microbiol., 54(4) : 335-338 .

5-**Adamski**, J.; M. Koivuranta and E. Leppänen (2006). Fatal case of myonecrosis an septicaemia caused by *Aeromonashydrophila* in Finland. Scandinavian *Aeromonassobria, and Aeromonascaviae*in a Sewage Treatment Pond. African aquaculture systems. Int. J. Food Microbiol., 114:295–306.

6-**Saavedra M.J.** ; Figueras M. and Martinez-Murcia A. (2006).Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. Int. J . Syst. Evol . Microbiol., 56: 2481–2487.

7-**Abdullah,** A.; Hart C. and Winstanley C. (2003). Molecular characterization and distribution of virulence associated genes amongst *Aeromonas* isolates from Libya. J. Appl. Microbiol., 95: 1001–1007.

8- **يوسف** , سامرقيونس، رشاعبدعليالخالدوعبدالكريمالقزاز (2008) . دراسة وراثية لبكتريا *Aeromonas* المنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز الصنف C . المجلة العراقية للعلوم . 49(2) : 57-63 .

9-**Holt, J.G.** ; Krieg, N.R. ; Sneath, P.H. and Williams, S.T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. Williams and Wilkins Puplication. London, New York.

10-**Martin-Carnahan**, A. and S.W. Joseph (2005). *Aeromonadaceae*. In Brenner, D.J. ; N.R. Krieg ; J.T. Staley and G.M. Garrity. eds. The Proteobacteria, Part B, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed. , Volume 2, Springer-Verlag, New York, NY.

11-**Mohamed, N.** ; Sung, K. ; Saeed A. Khan ; Ashraf A. Khan and Roger Steele (2006). Biochemical and Molecular Characterization of Tetracycline-Resistant *Aeromonasveronii*Isolates from Catfish. App. Environ. Microbiol., 72(10) : 6461–6466.

12-**Sarkar, A**. ; Saha M. and Roy P.(2012). Identification and typing of *Aeromonashydrophila* through -PCR Fingerprinting . J. Aquacult. Res. Devel., 3(6):146.

13-**Sambrook**, J. ; Fritsh, E. and Maniatis, (1989) . Molecular cloning laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory.

14- **المجمعي** , إيمان جواد كاظم (2002). دراسة بيئية وفسلجية لجرثومة *Aeromonashydrophila* ودور السم المعوي في إمراضيتها . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة بغداد .

15- **ابراهيـــم** , رواء خليل (2002) . دراسة بعض عوامل الضراوة لبكتريا*Aeromonashydrophila* المعزولة من حالات مرضية . رسالة ماجستير. كلية العلوم . جامعة بغداد .

16-**الفتلاوي** ,حوراء ناطق كبروت (2009) . دراسة بكـتريولوجية وجزيئية لبكتريا *Aeromonashydrophila* المعزولة من عينات سريرية وبيئية 0 رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة الكوفة .

17-**Bijay, K.** ; Amin A. ; Mark A. ; Richard L. ; Amy J. (2010). Distribution of virulence factors and molecular finger-printing of *Aeromonas* Species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission. Appl. Environ. Microbiol.,76(7): 2313–2325.

18-**Gehua W.** ; Clifford G. ; Chenyi Liu ; Chad Pucknell et al.(2003). Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonashydrophila*and*Aeromonassobria* by Multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. ,41(3) : 1048–1054 .

19-**Ramalivhana , J.N.** ; Obi C.L. and S.R. Moyo(2010). Prevalence of extended-spectrum β-Lactamases producing *Aeromonashydrophila* isolated from stool samples collected in the Limpopo province, South Africa. Afr. J. Microbiol. Res., 4(12): 1203-1208 .

20-**Al- Ammar**, M. H. (2012). Detection of extended-spectrum β-lactamases in *Aeromonashydrophila* isolated from stool samples in the babylon province iraq. Inter. Res. J. Microbiol., 3(9) : 317-321 .

21-**Shah, A.A.** ; Hasan, F. ; Ahmed, S. and Hameed, A. (2004). Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of gram-negative bacilli producing extended-spectrum beta-lactamases. Res. Microbiol., 155: 409-421.

22-**Bush, K.** (2001). New β-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin. Infect. Dis., 32: 1085-1089.

23-**Bradford, P.A**. (2001). Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century : characterization,epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin. Microbiol. Rev., 14: 933-51.

24-**Tasl, H.** and Bahar, H. (2005). Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended spectrum β-lactamases in hospital-based Enterobacteriaceae in Turkey, J. Infect. Dis., 58: 162-167.

25-**Canton, R.** ; Oliver A. ; Coque T.M. ; Varela M. ; Perez-Diaz J.C. and Baquero F.(2002). Epidemiology of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacter* isolates in Spanish hospital during a 12 year period, J .Clin. Microbiol., 1237-1243.

26-**Chi W.** ; Yin. C. ; Mei. L. ; Chin L. ; Hsin L. (2011). Bacteremia due to extended-spectrum-β-lactamase-producing *Aeromonas*spp. at a medical center in Southern Taiwan. J. Antimicrob. Chemoth. , (55) 12: 5813–5818.

27-**Canton, R.** ; Oliver A. ; Coque T.M. ; Varela M. ; Perez-Diaz J.C. and Baquero F.(2002). Epidemiology of extended spectrum beta-lactamase

producing *Enterobacter* isolates in Spanish hospital during a 12 year period, J .Clin. Microbiol., 1237-1243.

28-Janda, J.M. and Abbott, S.L. (2010). The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. Clin. Microbiol. Rev., 23 (1): 35-73.

29-Cattoir, V. ; L. Poirel ; C. Aubert ; C.J. Soussy and P. Nordmann (2008). Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. Emerg. Infect. Dis.,14: 231–237.

30-Picao, R.C. ; L. Poirel ; A. Demarta ; C.S. Silva ; A.R. Corvaglia ; O. Petrini, and P. Nordmann(2008). Plasmid- mediated quinolone resistance in *Aeromonasallosaccharophila* recovered from a Swiss lake. J. Antimicrob. Chemoth., 62:948–950.

*Molecular Study of *Aeromonas* spp. Isolated from Clinical and Environmental Samples

Receved :7/4/2015 **Accepted : 9/6/2015**

Safaa M. Salman and Azhar N. Hussien

AL-Qadisiya University / Collegeof Education / Biology Department

E-Mails: safaaa.munim@yahoo.com

Abstract

A total of 259 specimen from different clinical sources from patients of AL-Diwanyia's hospitals and environmental sources (water) were collected. Biochemical and morphological characterization tests besides the use of API 20 E and Vitek System and Polymerase Chain Reaction (PCR)Technique which used 16S rDNA geneshowed that seventeen isolates were identified as *Aeromonas* spp. These Isolates distributed as : 8 isolates belong to *A. hydrophila* , 4 isolates belong to *A. sobria* , 4 isolates belong to *A. caviae* and one isolate belong to *A. salmonicida* . PCR was used for detecting virulence factors such as exotoxin genes : *hemolysin* (*hly A) , aerolysin(aer A)* and *cytolytic enterotoxin (aer)* , results showed that 77.7% and 62.5% of environmental and clinical isolates had *hly A* while 44.4 % and 50 %

had *aer A* , *aer* gene just found in clinical isolates in rate 25% while didn't found in environmental isolates .The same technique (PCR)was also used for detecting resistance genes of beta - lactam antibiotic : bla_{CMY}, bla_{TEM}, $bla_{CTX\text{-}M}$, and bla_{SHV} genes which used in this study . The results showed that 11.76% had bla_{CMY} *gene* , 5.88% had bla_{TEM} *gene* and 17.64% had $bla_{CTX\text{-}M}$ *gene* of all isolates , while bla_{SHV} *gene* didn't found in all the types of isolates which isolated from clinical and environmental sources .

Keywords :*Aeromonas* ,Aerolysin ,Hemolysin ,Cytolytic enterotoxin.

***The Research is apart of on M.Sc. thesis in the case of the First researcher**

.