المجلة العراقية للبحوث الإنسانية والإجتماعية والعلمية
Iraqi Journal of Humanitarian, Social and Scientific Research
Print ISSN 2710-0952 Electronic ISSN 2790-1254
العـــدد 17S حزيران 2025
No.17S JUNE 2025

عزل وتشخيص ومقاومة بكتريا *A.hydrophila* لبعض المضادات الحيوية

الباحثة : هديل تركي حسين
أ.د. أزهار نوري حسين
كلية التربية – جامعة القادسية
edu.bio.posta139@qu.edu.iq

ملخص البحث

تهدف الدراسة الى تحديد بعض العزلات البكتيرية المرافقة لبعض الحالات السريرية ودراسة مقاومتها للمضادات الحيوية المختلفة . تم التشخيص الاولي للعزلات البكتيرية إعتماداً على الصفات المظهرية والمجهرية بأستخدام الاوساط الزرعية الملائمة وسط آكار الماكونكي ووسط آكار الدم ،أُستخدمت الاختبارات البايوكيميائية ونظام الفايتك لتأكيد التشخيص النهائي للعزلات البكتيرية ، تم تاكيد التشخيص بإستخدام تقنية الPCR تم تحديد تسلسل الحامض النووي DNA لتأكيد تشخيص عزلات البكتريا قيد الدراسة. جُمعت 200 عينة سريرية من المرضى الراقدين في مستشفى مدينة الديوانية للمدة من 2024/12/1 لغاية 2025/3/3 وشملت العينات السريرية الخروج 110 عينة والادرار40 عينة والدم 22 عينة والجروح 18عينة والحروق 10عينة ، كان الزرع المختبري 26 عينة ذات نمو موجب و174 عينة ذات نمو سالب .بينت نتائج العزل إن أعلى نسبة للخمج تم الحصول عليه من الخروج يليها الادرار ثم الدم ثم الجروح والحروق على التوالي . تم إختبار مقاومة البكتريا تجاه مجاميع مختلفة من المضادات الحيوية وقد أظهرت العزلات تفاوتاً ملحوظاً في نسب المقاومة للمضادات الحيوية .فقد بينت النتائج ظهور مقاومة تامة لمضاد ceftazedim ومضاد Erthromycinو Levofloxacin بنسبة بلغت 100% ومقاومة عالية تجاه مضاد Chloramphenicol بنسبة بلغت 96.2 % و92.3% على التوالي

الكلمات المفتاحية : *A.hydrophila* ،الامراضية ،PCR, المقاومة .

Isolation, diagnosis and resistance of Aeromonas hydrophila to some antibiotics

Hadeel Turki Hussein
Prof. Azhar Nouri Hussein

Abstract

The study aims to identify some bacterial isolates associated with some clinical cases and study their resistance to different antibiotics. Initial diagnosis of the bacterial isolates was made based on phenotypic and microscopic characteristics using appropriate culture media, MacConkey medium and blood agar medium, biochemical tests and phytochemical system were used to confirm the final diagnosis of the bacterial isolates, the diagnosis was confirmed using PCR technique and DNA sequencing to confirm the diagnosis of the bacterial isolates under study. 200 clinical samples were collected from patients lying in Diwaniyah City Hospital for the period from 1/12/2024 to 3/3/2025. The clinical samples included 110 samples, 40 samples, blood 22 samples, wounds 18 samples and burns 10 samples, the laboratory culture was 26 samples with positive growth and 174 samples with negative growth. The isolation results showed that the highest rate of infection was obtained from the exit, followed by wounds, blood, wounds

and burns, respectively. Bacterial resistance to different antibiotic combinations was tested and the isolates showed a significant variation in antibiotic resistance rates. The results showed 100% resistance to ceftazedim, erythromycin and levofloxacin and high resistance to chloramphenicol with a rate of 96% and 92.3% respectively.

Keyword : *A.hydrophila* ، Pathogenicity, antibiotic

المقدمة Introduction

تعد بكتريا *Aeromonas hydrophila* سالبة لصبغة كرام هوائية ولا هوائية اختيارية يبلغ حجم خلايا بكتريا الـ *Aeromonas* 0.3-1.0 × 1.0-3.5 ميكرومتر، تكون بشكل عصيات مكورة أو قضبان قصيرة مستقيمة ذات نهايات مستديرة. تتواجد منفردة أو على شكل أزواج، ونادراً ما تكون على شكل سلاسل قصيرة جداً او على هيئة أشكال خيطية (Bravo & Figueras, 2020) . تسبب بكتريا *A.hydrophila* مجموعة متنوعة من الامراض وتسبب في الغالب تسمم الدم (Septicemia) وعدوى المسالك البولية (urinary tract infection) وخمج شغاف القلب (Endocarditis) وإصابات الجروح والحروق(infactions Wounds and burns) والاسهال (Stool) ، يمكن أن تتواجد بكتيريا *A.hydrophila* في الجهاز الهضمي البشري ويمكن أن تسبب الأمراض الهضمية في البشر، يمثل التهاب المعدة والأمعاء الناجم عن هذه البكتيريا مشكلة في المقام الأول لدى الأطفال، ولكن يمكن أن تحدث أيضًا لدى الأشخاص الذين يسافرون بشكل متكرر إلى البلدان النامية، هذه البكتيريا مزودة بعدد من عوامل الضراوة التي تسمح بدخولها إلى أنسجة المضيف وتكاثرها لاحقاً (Navarro& Martínez-Murcia, 2018) إذ كان إكتشاف المضادات الحيوية الأثرالكبير في خفض معدلات الامراض المختلفة لكن الاستخدام العشوائي لهذه المضادات أدى الى تطور مقاومة هذه البكتريا للمضادات الحيوية ومن المحتمل أن يكون هذا الانتقال نتيجة تناول الأدوية على المدى الطويل في الحيوانات المخصصة للاستهلاك (Elbehiry *et al.*,2019) مما أدى الى زيادة معقدة في مستوى المقاومة لها ولهذا تم تسجيل مقاومة عالية ومتباينة بين العزلات لبكتيريا *A.hydrophila*. ولأهمية هذه الالية في المقاومة وما لها دور في احداث الخمج والامراض المعدية لهذه البكتريا جاءت هذه الدراسة للتحري عن هذه الالية من الناحية المظهرية والجينية المسيطر عليها باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل polymerase chaine reaction(PCR) ، ولتحقيق ذلك تضمنت الدراسة المحاور الاتية :

1. عزل بكتريا *A. hydrophila* من حالات سريرية مختلفة وتشخيصها بأستخدام الطرق التقليدية والجزيئية إعتماداً على الجين التشخيصي *16S rRNA* .
2. التحري عن مقاومة *A. hydrophila* لعدد من المضادات الحيوية مظهريا

طرائق العمل Methodes

جمع العينات Samples collection : جمعت 200 عينة سريرية من المرضى الراقدين في مستشفى الديوانية العام التعليمي ومستشفى النسائية والأطفال والمراجعين في العيادات الخارجية في مدينة الديوانية ولمختلف الفئات العمرية ولكلا الجنسين للفترة من 2024/12/1 إلى 2025/3/3 وبأعمار تراوحت بين 7-35 سنة وقد شملت الدراسة جمع العينات المختلفة وكما يأتي: عينات الخروج 110 عينة ، عينات الأدرار 40 عينة ، عينات الجروح والحروق 18عينة ، عينات الدم 22 عينة.

زرع العينات Culture samples : تم زرع عينة واحدة من العينات المرضية الخروج (stool) والادرار (urine)والدم (blood) والحروق والجروح (Burns &wounds) على كل من وسط اكار الدم واكار الماكونكي عند درجة حرارة 37م° ، ثُم أُخذت مستعمرة واحدة من كل نمو موجب أولي للمزرعة وتكرار النمو للحصول على مزرعة نقية ثم تشخيصها اعتمادا على الخصائص المورفولوجية وتحلل الدم وشكل المستعمرة وحجمها ولونها .

الخصائص الزرعية Cultural characteristics : شخصت العزلات البكتيرية النامية على الأوساط الزراعية اعتماداً على الخصائص المزرعية المتضمنة شكل المستعمرات وحجمها ولونها ، ،إذ تم دراسة اشكال المستعمرات النامية وخصائصها الـزرعية والنمو أو عـدم النمو على الأوسـاط التفريقية كما شخصت بكتريا قيد الدراسة على وسط اساس كروم الصلب Chromagar Orientationالذي يعتبر وسطا تشخيصي لها (Wahid *et al.*,2019) .

خصائص المجهرية Microscopic characteristics : شخصت البكتريا قيد الدراسة مجهرياً وذلك بأخذ جزء من المستعمرة النقية الموجودة على وسط الماكونكي آكاربعمر 24 ساعة بواسطة ناقل معقم وتم تصبيغها بصبغة كرام ثم فُحصت تحت المجهر الضوئي بإستعمال العدسة الزيتية وبقوة تكبير 100x وملاحظة صفات الخلايا مثل لونها وشكلها وطريقة تجمعها بالإضافة الى دراسة الصفات الشكلية التي تتضمن شكل المستعمرة ولونها وحافاتها وارتفاع المستعمرة (Wahid *et al.*,2019) .

التشخيص بأستخدام جهاز Vitek 2 compact : أُجري بأستخدام جهاز الفايتك بإتباع الخطوات التالية .

1-أُخذ جزء صغير من مستعمرة فتية بعمر أقل من 20 ساعة بواسطة ماسحة قطنية معقمة (Swab) ووضعت في أنبوب زجاجي حاوي على محلول ملحي Inhalation Solution بتركيز 0.45 % و pH 4.5 -7 ثم ضبطت الكثافة في مدى يتراوح بين 0.4-0.6 بواسطة جهاز Densi chek .

2- وضعت كاسيتات التشخيص في محفظة الكاسيتات التي تم ترقيمها بالتتابع حيث أدخلت أنبوبة كل كاسيت في أنبوبة زجاجية حاوية على المعلق البكتيري والمحلول الملحي .

3-نُقلت المحفظة ومحتوياتها الى جهاز الماسح الضوئي (Adaptus)لغرض قراءة الباركود الخاص بكل كاسيت وحفظت المعلومات الخاصة بالعينات في جهاز الكمبيوتر الخاص بجهاز الفايتك .

3- أدخلت العينات بعد ان اكتملت عملية القراءة الى الحجرة الأولى لجهاز الفايتك لغرض قراءتها من قبل الجهاز (تستغرق هذه المرحلة 70 ثانية) بعدها تظهر إشارة على الجهاز تشير الى عملية نقل المحفظة الى الحجرة الثانية وتترك العينات في الجهاز لحين إكتمال عملية التشخيص (تستغرق هذه المرحلة 12 ساعة).

اختبار مقاومة البكتريا قيد الدراسة للمضادات الحيوية Testing the resistance of bacteria under study to antibiotics

اختبرت المقاومة الدوائية للعزلات البكتيرية وفق طريقة إنتشار الأقراص (Disc diffusion method) أو طريقة (Kirby-Bauer) إتجاه عدد من المضادات الحيوية من مجاميع مختلفة وبحسب ماورد في CLSI (2021) وكالاتي :

1-لُقحت أنابيب إختبار معقمة تحتوي على 5 مل من المحلول الملحي الفسلجي بمستعمرات نقية وفتية منماة على وسط الدم ثم مُزج العالق بالمازج الدوار لمدة 15 ثانية ، قُورنت مع محلول ثابت العكورة القياسي (ماكفرلاند 0.5) الذي يُعطي عدداً تقريبياً للخلايا (1.5×10^{8} خلية /مل).

2-نُشر بمقدار0.1مل من العالق البكتيري بأستخدام ماسحة قطنية معقمة (Swab) على سطح أطباق حاوية على وسط مولر هنتون الصلب Muller Hinton agar بطريقة التخطيط وبعدة إتجاهات للتأكد من نشر البكتريا المراد اختبار مقاومتها بالتساوي .

3- نُقلت أقراص المضادات الحيوية بملقط مُعقم الى الاطباق وبواقع 5 أقراص في الطبق الواحد وحضنت الاطباق بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة .

4-سجلت النتائج اعتمادا على قياس قطر منطقة التثبيط المتكونة حول القرص بواسطة مسطرة مدرجة بوقورنت النتائج مع القيم القياسية المذكورة في (CLSI (2021 .

استخلاص المادة الوراثية Extraction of genetic material

تم إجراء استخلاص الحامض النووي DNA للبكتريا قيد الدراسة وذلك بأستخدام العدة التشخيصية DNA (Genomic extraction kit) وتم إجراء الاستخلاص بحسب تعليمات الشركة كآلاتي:

1- أُضيف 1مل من العالق البكتيري الى انابيب ابندروف قياس 1.5 وبعدها نقلت الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000-16000 دورة /الدقيقة لمدة دقيقة واحدة وذلك لجمع الخلايا البكتيرية ثم التخلص من السائل الطافي وترك الراسب .

2- أُضيف 200 مايكروليتر من محلول انزيم الايسوزايم (Lysozyme buffer)(20ملغم /مل) وبعدها مزج الخليط بواسطة المازج (vortex) لمدة 5 ثوان .

3- حضن المزيج بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق وخلال مدة الحضن تم تقليب الانابيب لضمان حدوث تحلل كامل للخلايا في المزيج .

4- بعدها تم إضافة 200 ميكروليتر من محلول GB Bufferالمجهز من العدة الى مزيج الخلايا المتحللة وتم مزجها جيدا بواسطة المازج vortex لمدة 5 ثوان .

5- حضن المزيج بدرجة حرارة 60 م° لمدة 10 دقائق بأستخدام الحمام المائي .

6- تم إضافة 200 مايكروليتر من الكحول الاثيلي المطلق الى المزيج المتحلل ومزج الخليط جيدا بجهاز المازج vortex لمدة 10 ثوان .

7- بعدها تم نقل الخليط من انبوبة ابندروف الى انابيب جمع collection tubes قياس 2 مل الحاوية على أعمدة تحوي مصفى لتنقية الحامض النووي GD fiter colum والمجهزة من العدة .

8- وضعت انابيب الجمع مع الاعمدة الحاوية على خليط في جهاز الطرد المركزي ودورت بسرعة 14000-16000دورة / الدقيقة لمدة دقيقة للتخلص من نواتج الخلايا المتحللة .

9- تم التخلص من المحلول الراسب للخلايا المتحللة ونقل ال GD colum الحاوي على الحامض النووي الى انبوبة جمع collection tube جديدة .

10- بعدها تم إضافة 400 مايكروليتر من محلول ال W1 Buffer المجهز مع العدة الى العمود الحاوي على المصفى لغسل الحامض النووي ووضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000-16000 دورة /الدقيقة لمدة 30 ثانية .

11- تم التخلص من الراسب وبعد ذلك يتم إضافة 600 مايكروليتر من محلول الغسل الحاوي على الكحول الاثيلي المطلق Wash buffer المجهز مع العدة الى العمود الحاوي على الحامض النووي للتخلص من الدهون داخل العمود ووضعت الانابيب داخل جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000-16000دورة /الدقيقة لمدة 30 ثانية .

12- تم التخلص من الراسب وأعيدت الانابيب الى جهاز الطرد المركزي مرة ثانية لتجفيف الاعمدة بسرعة 14000-16000 دورة /الدقيقة .

13- تم نقل الاعمدة الحاوية على الحامض النووي الى أنابيب ابندروف معقمة وأضيف 50 مايكروليتر من محلول الاذابة Elution buffer المجهز مع العدة الى وسط العمود وتركها لمدة 5 دقائق وبعدها وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000-16000 دورة/الدقيقة لمدة 30 ثانية لاذابة الحامض النووي وحفظ بدرجة حرارة -20 م° لحين إجراء فحص تفاعل السلسلة المتبلمر .

تقدير تركيز ونقاوة DNA Estimation concentration and purity of DNA

استعمل جهاز قياس تركيزالـ DNA Nano drop Spectrophotometer لقياس نقاوة وتركيز الحامض النووي الجيني للبكتريا قيد الدراسة ، حيث يتم الكشف عن الحامض النووي من خلال تحديد تركيز الحامض النووي DNA بالنانو غرام /مايكروليتر و وقياس نقاوة الحامض النووي DNA من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين (260/280nm) نانومتر وتم أستخدام الجهازعلى النحو الأتي:

1-بعد تشغيل جها ز Nanodrop تم أختيار برنامج قياس الحامض النووي نوعDNA .

2-تم تصفير ركيزة المقياس مرتين وذلك بوضع 1 مايكروليتر من Free Nuclease Water بأستخدام (Micropipette) معقمة على سطح ركيزة المقياس وإجراء التصفير وبعدها نقوم بتنظيف الركيزة بأستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز.

3-تم وضع 1 ميكروليتر لكل عزلة من الـ DNA المستخلص على ركيزة مقياس الجهاز ومن ثم ضغط زر OKلبدء عملية قياس تركيز الـ DNA بعدها تم تنظيف الركيزة لقياس العينة التالية .

تفاعل تضاعف البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)

تم إجراء هذا التفاعل للكشف عن الجين التشخيصي *16S rRNA* وكذلك للتحري عن جينات الانزيمات المحورة للامينوكلايكوسيدات

تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة PCR Master mix

يتم تحضير تفاعل انزيم البلمرة بأستخدام عدة AccuPower® PCR premix المجهز من شركة Bionner الكورية وبحسب تعليمات الشركة كالاتي

1-تم تحضير مزيج تفاعل انزيم البلمرة في انابيب PCR المجهز مع العدة والحاوية على مكونات تفاعل انزيم البلمرة واضيفت المكونات الأخرى لمزيج تفاعل وبحسب تعليمات الشركة

2-بعد اكتمال تحضير مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل أُغلقت الانابيب ومُزجت محتوياتها بعناية بجهاز المازج(vortex) لمدة 10 ثوانٍ .

3-تم نقل الأنابيب لجهاز PCR Thermocycler لأستكمال الدورات الحرارية PCR (Thermocycler conditions) .

مكونات وحجوم مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

ت	المكونات	الحجم بالمايكروليتر
1	PCR master mix	25 µl
2	Template DNA	5 µl
3	Forward Primer	3 µl
4	Reversed Primer	3 µl
5	Deionized Nuclease Free Water	14 µl
6	Total Volume	50 µl

مراحل تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) في جهاز الدورات الحرارية

PCR Step	Repeat cycle	Temperature	Time
Initialdenaturation	1	95C	5min
Denaturation	30	95C	30 Sce
Annealing		(58°C) (52°C)	30Sce
Extension		72C	1min
Final extension	1	72C	5min
Hold	-	4C	Forever

1 = 16S rRNA gene 2 = Antibiotic resistance genes

4. الفصل الرابع

4-1 توزيع العينات السريرية وفق مصدر العزل

Distribution of the clinical specimens according to source isolation

توزيع عدد عزلات *A.hydrophila* بحسب نوع العينة وعزلتها

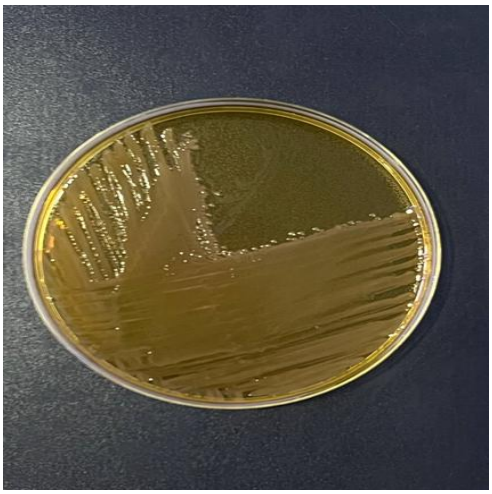
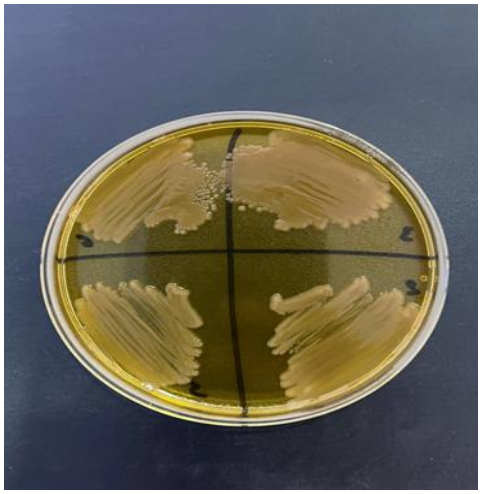
ت	العينات السريرية	حجم العينات الكلي	النمو الإيجابي لبكتريا *A.hydrophila*	النمو السلبي
1	الخروج	110	(14.5)16	(85.4) 94
2	الأدرار	40	(17.5)7	(82.5) 33
3	الدم	22	(9.1)2	(90.9)20
4	الجروح	18	(5.6)1	(94.4)17
5	الحروق	10	-	-
6	المجموع	200	(13) 26	(87)174
7	قيمة مربع كاي	1.96		
8	قيمة p المحسوبة	0.5803		

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان اعلى نسبة عزل كانت من الخروج بنسبة 14.5% (جدول 4-1) تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ماتوصل اليه Semwal *et al.*(2023) كانت نسبة العزلات الموجبة (14%)الذي اوضح ان بكتيريا *A. hydrophila* سببت آثارًا مرضية متنوعة، بما في ذلك التهاب المعدة والأمعاء المصحوب بأعراض مثل الإسهال المائي أو الدموي، والالتهابات الجهازية التي قد تؤدي إلى التهاب الشغاف القلبي البكتيري، وتسمم الدم التنخري، والاضطرابات التقرحية. واوضحت نتائج دراسة (Hashim & Nema (2018 التي اجريت على الاطفال المصابين بالاسهال حيث بلغت عدد العزلات التي جمعاها 12 عزلة بنسبة بلغت 14% من مستشفى الزهراء والشهيد الصدر في النجف الاشرف من الخروج، واشارت الى أن جميع العزلات لديها القدرة على إنتاج إنزيمات الهيمولايسين والبروتيز والليبيز والفوسفولايبيز والجيلاتينيز والبيوفيلم على اكار الكونغو الأحمر واكثر انتشارا عند الاطفال مقارنة مع البالغين.

العزل والتشخيص **Isolation and identifaction**

التشخيص المظهري **Morphological and identifaction**

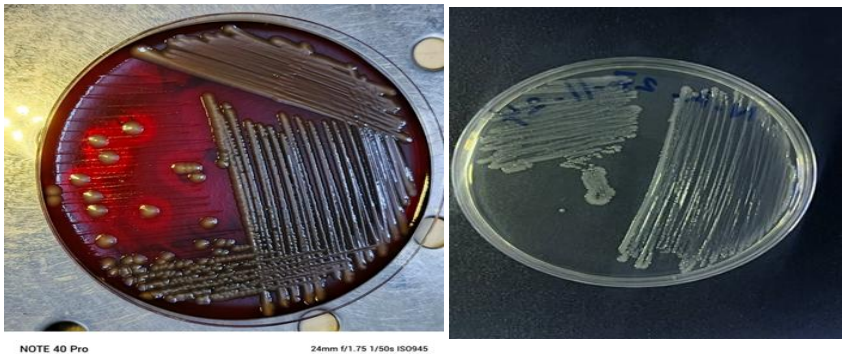
شخصت عزلات بكتريا *A. hydrophila* مبدئياً بالأعتماد على الصفات المظهرية حيث تم تنميتها على كل من وسط MacConkey agar، و وسط اكار الدمBlood agar ، بعدها شُخصت العزلات قيد الدراسة على وسط chromagar الذي يُعد وسطاً تشخيصياً بالأعتماد على لون البكتريا

الشكل

(1)مستعمرات *A.hydrophila* على وسط MacConkey

وكانت العزلات التي تم تنميتها على وسط اكار الدم الشكل (2-4) محدبة ومستديرة و ملونة باللون الأبيض الى رمادي ومحللة للدم تحللا كاملاً من نوع بيتا β-hemolysis ،مما يدل على انتاج انزيم الهيمولايسين hemolysin وقد ظهرت بشكل مستعمرات كريمية او رمادي مخضر وظهرت المستعمرة بشكل واضح وكثيف واتفقت نتائج دراستنا مع Al-Maleky (2013) الذي اوضح ان اختبارات انحلال الدم تُستخدم لبكتيريا *A.hydrophila* للكشف عن قدرة هذه البكتيريا على تحليل خلايا الدم الحمراء، وهو ما قد يكون علامة على ضراوتها، ومن المعروف أن أنواع بكتيريا *Aeromonas*، وخاصةً *A.hydrophila*، تُنتج الهيموليسين، وهي سموم قد تُتلف خلايا الدم الحمراء أو تُدمرها، فعند زرع بكتيريا *A.hydrophila* على أطباق اكار الدم (عادةً 5% من اكار دم الأغنام) تُنتج البكتيريا الهيموليسين، مكونة منطقة انحلال دم حول المستعمرة، مما يُشير إلى أن البكتيريا قد حللت خلايا الدم الحمراء ، اذ تُظهر النتيجة الإيجابية مظهرًا صافيًا أو غائمًا بسبب انحلال الدم ويُعتبر انحلال الدم مؤشرًا على القدرة الإمراضية في البكتيريا ، حيث يُشير إلى وجود سموم قد تُسبب تلف الأنسجة والمرض



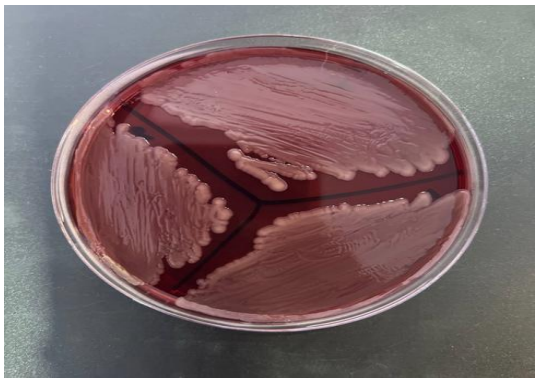
(A)

(B)

A - الشكل (4-2) مستعمرات *A.hydrophila* على وسط Blood agar

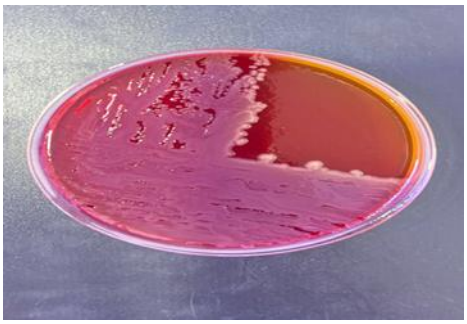
B- الشكل (4-3) مستعمرات *A.hydrophila* على وسط Nutrient agar

أستخدم وسط TSI للتمييز بين البكتيريا بناءً على قدرتها على تخمير السكريات وإنتاج كبريتيد الهيدروجين الشكل (4-4)، ظهرت بكتريا *A. hydrophila* على الوسط الزرعي TSI agar ذو لون وردي دلاله على تخمر الكلوكوز،غالباً ماتنتج تشققات او فقاعات على الاكار ، والنتيجة تتفق مع ما توصل اليه Soren (2021) اذ تم زراعه بكتيريا *A. hydrophila* في أنابيب الاكار TSI لمدة 24 ساعة، وظهرت بعض العزلات بلون احمر في الجزء العلوي المائل(قاعدي) ولون اصفر في الجزء القاعدي (حامضي) ، دون انتاج غاز H2S ،لا تُنتج *A.hydrophila* كبريتيد الهيدروجين على أكار TSI، وهي سمة رئيسية أخرى تُميزبها هذه البكتيريا والتي قد تُنتج راسب أسود بسبب إنتاج كبريتيد الهيدروجين.



الشكل (4-4) مستعمرات *A.hydrophila* على وسط TSA

ظهرت مستعمرات البكتريا *A. hydrophila* على وسطTSA agar ذو لون وقوام زبداني (يشبه الزبدة وسهل الالتقاط) الشكل (4-5) وتتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه(Pauzi *et al*., 2020) على اكار TSAإذ تظهر بكتيريا *A. hydrophila* بشكل مستعمرات دائرية يتراوح قطرها تقريباً بين 2 -4 ملم بعد 24 ساعة وناعمة و صفراء او مائل للصفرة، أو بيج فاتح وذات حافات غير منتظمة غالبًا ما تكون هذه المستعمرات معتمة، عادةً ما تكون مستعمرات *Aeromonas* spp غير مصبوغة على TSA، ولكنها قد تكتسب لونًا أسمرًا فاتحًا مع التقدم في عمرالمستعمرة .



الشكل (4-5)مستعمرات *A.hydrophila* على وسط TSA

التشخيص المجهري microscopic diagnosis

فحصت العزلات البكتيرية تحت المجهر الضوئي بعد تصبيغها بصبغة كرام(Gram stain) وبأستخدام العدسة الزيتية وذلك عن طريق تحضير مسحة من المستعمرة النامية على وسط اكار الماكونكي عمرها 24 ساعة ،وذلك لغرض التعرف على شكلها وطريقة ترتيبها ،حيث ظهرت بشكل مستعمرات عصوية قصيرة

ذات نهايات مدورة وردية اللون سالبة لصبغة كرام ظهرت بهيئة أزواج (pairs) او بهيئة خلايا مفردة (single) وهذا يتفق مع(2025).Abo-Shama *et al* .

الأختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

تم اجراء الأختبارات الكيموحيوية biochemical على العزلات قيد الدراسة ووفقاً لمايلي :

إختبار الكاتاليز Catalase test

بينت النتائج قدرة العزلات على إنتاجها لأنزيم الكاتاليز(الجدول 4-2) ، اذ ان بكتريا الـ *A.hydrophila* قد عملت على تحليل الكاشف بيروكسيد الهيدروجين الى ماء و أوكسجين وذلك بظهور فقاعات هوائية على سطح الشريحة الزجاجية الحاوية على البكتريا ، واتفقت نتائج دراستنا مع Semwal *et al*. (2023)و Lenchenko *et al*. (2022) الذين اوضحوا ان بكتيريا *A. hydrophila* تُنتج إنزيم الكاتاليز كما اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع Fernández-Bravo (2020) حيث اشارا الى عدة أنواع من بكتيريا *Aeromonas*، بما في ذلك النوع *A.hydrophila*،التي كانت إيجابية الكاتاليز، تُعد هذه النتيجة الإيجابية سمة أساسية تُستخدم في تحديد بكتيريا *Aeromonas* حيث يُجرى اختبار الكاتاليز عادةً بوضع مستعمرة من المزرعة البكتيرية على شريحة وإضافة قطرة من بيروكسيد الهيدروجين، تظهر النتيجة إيجابية في حال وجود الكاتاليز.

إختبار الاوكسيديز Oxidaase test

أظهرت العزلات العائدة لبكتريا *A.hydrophila* نتيجة موجبة لفحص oxidase test (الجدول 4-2)، من خلال تحول لون المستعمرات الى الارجواني عند اضافة الكاشف، مما يؤكد على إن البكتريا تمتلك انزيم Oxidase cytochrome كمستقبل للهيدروجين، فقد اتفقت مع (Hunt *et al*. (1998 الذين اوضحوا ان اختبار الأوكسيديز إيجابي لبكتيريا *Aeromonas*، أي أنها تُنتج إنزيم السيتوكروم أوكسيديز، ويُستخدم هذا الاختبار للمساعدة في تمييز *A.hydrophila* عن غيرها من البكتيريا السالبة، اذ ان اختبار الأوكسيديز يعتمد على الكاشفً (رباعي ميثيل-بارا-فينيلين ديامين (tetramethyl-p-phenylenediamine الذي يتأكسد بواسطة السيتوكروم أوكسيديز، مما يُسبب تغيرًا في اللون، ظهرت النتيجة الإيجابية (أزرق داكن أو بنفسجي) خلال 10-30 ثانية، أما النتيجة السلبية (بدون تغير في اللون أو تغير في اللون بعد أكثر من 30 ثانية) فتشير إلى عدم وجود أوكسيديز السيتوكروم.

إختبار الاندول Indole test

أظهرت عزلات *A.hydrophila*نتيجة موجبة لفحص الاندول (جدول4-2) ،بدليل تكون حلقة حمراء على سطح الوسط في طبقة الكحول الأيزوميلي (isoamyl alcohol) نتيجة لتحلل الحامض الأميني التربتوفان triptophane بواسطة انزيم tryptophase ، ويعد هذا الكشف مهماً في التفريق بين بكتريا *A.hydrophila* وافراد العائلة المعوية الاخرى وذلك بعد الكشف عنه باستعمال كاشف كوفاكس kovac's (reagent) .

إختبار المثيل الأحمر Methyle red test

أعُطيت العزلات البكتيرية المشخصة نتيجة موجبة لأختبار أحمر المثيل ،(الجدول 4-2) تتمتع بعض البكتيريا بالقدرة على استخدام الكلوكوز وتحويله إلى حامض مستقر، مثل حمض اللاكتيك أو حمض الأسيتيك أو حمض الفورميك، كمنتج نهائي.تستقلب هذه البكتيريا الجلوكوز في البداية إلى حامض البيروفيك، والذي يُستقلب بدوره عبر مسار الأحماض المختلطة لإنتاج الحامض المستقرحيث يُخفض الحامض الناتج

درجة الحموضة (pH) إلى 4.5 أو أقل، وهو ما يُشير إليه تغير لون أحمر الميثيل من الأصفر إلى الأحمر. وهذا يتوافق مع Wejdan *et al.* (2014) الذين أُستخدموا اختبار أحمر الميثيل لاختبار الكائنات المُخمِّرة، التي تُحوّل السكريات مثل الكلوكوز إلى أحماض عضوية مستقرة متنوعة مثل بكتريا *A.hydrophila* عبر مسار الأحماض المختلطة، يُستخدم هذا الاختبار بشكل رئيسي للتمييز بين أنواع مختلفة من البكتيريا المعوية، بما في ذلك الايروموناس والسالمونيلا، والإشريكية القولونية، والبروتيوس، اذ يُعطي اختبار أحمر الميثيل (MR)، عند استخدامه مع أنواع *Aeromonas*، نتيجة إيجابية بشكل عام ويكون التشخيص الإيجابي بتغير اللون الى الأحمر في مرق MR-VP بعد إضافة كاشف الميثيل الأحمر ويُعد هذا الأختبار مهماً للتمييز بين أنواع بكتريا *Aeromonas* .

إختبار إستهلاك السترت **Citrate utilization test**

كما أظهرت جميع العزلات في أختبار إستهلاك السترات نتيجة موجبة (الجدول 4-2)، بوصفه المصدر الوحيد للكاربون ولوحظ تغير لون الوسط من الأخضر الى الأزرق نتيجة لزيادة الاس الهيدروجيني عند مستوى أعلى من الرقم الهيدروجيني 7.6 . تُنتج هذه البكتيريا عند النمو في هذا الوسط إنزيمًا يُسمى سترات-بيرميزcitrate-permease ، قادرًا على تحويل السترات إلى بيروفاتpyruvate . يدخل البيروفات بعد ذلك في الدورة الأيضية لهذه البكتريا لإنتاج الطاقة. و ويدل تغير اللون من الاخضر الى الازرق على استخدام السترات كمصدر للكاربون ، وهو مُستقلب وسيط في دورة كريبس.

إختبار الاسكولين **Asculine test**

أما إختبار تحلل الاسكولين فقد أظهرت جميع العزلات نتيجة موجبة وذلك بتحول الوسط الى اللون الأسود دلالة على تحلل الاسكولين وهو من الاختبارات الكيميائية المهمة ويُستخدم تحليل الإسكولين كأداة تصنيفية لتحديد مجموعة واسعة من الكائنات الدقيقة، بما في ذلك عائلة البكتيريا المعوية،واللاهوائية. ويُعدّ تحليل الإسكولين اختبارًا تفريقيًا يُميز بين البكتيريا بناءاً على قدرتها على التحلل .

إختبار تخمر السكريات **Suger fermentation test**

أما بالنسبة لاختبار تخمر السكريات فقد أظهرت العزلات نتيجة موجبة لأختبار تخمر الكلوكوز والاكتوز وتحول لون الوسط الى الأصفر(الجدول 4-2) ، وهذا ما اكدته بعض الدراسات مثل دراسة Pritom *et al.* (2022) الذي اوضحوا أن أنواع بكتيريا *A.hydrophila* تُخمّر مجموعة متنوعة من السكريات، بما في ذلك الكلوكوز والسكروز والمانوز،وهي عادةً ما تكون إيجابية للأوكسيديز والكاتاليز، وهي لاهوائية اختيارية، اذ تستخدم بكتيريا *A.hydrophila* تخمير السكر لإنتاج الطاقة، مع إنتاج بعض الأنواع للأحماض والغازات مما يؤدي إلى ظهور مستعمرات صفراء على بيئات معينة مثل اكار TCBS، كذلك يمكن ان تُخمّر بعض سلالات *A.hydrophila* أيضًا السيلوبيوز والمالتوز وD-غالاكتوز وD-مانيتول والتريهالوز، في حين هذه البكتريا لا تخمربعض السكريات ، بما في ذلك الأدونيتول، وإل-أرابينوز، ود-أرابيتول، ودولسيتول، وإريثريتول، وميو-إينوزيتول، ولاكتوز، ورافينوز، وإل-رامنوز، ود- سوربيتول، ود-زيلوز، تُجرى اختبارات التخمير عادةً على بيئات خالية من السكريات القابلة للتخمير، مثل اكار ماكونكي، لأن الحموضة الناتجة عن التخمير قد تتداخل مع الاختبارات الأخرى.

التشخيص بأستخدام جهاز Vitek 2 compact

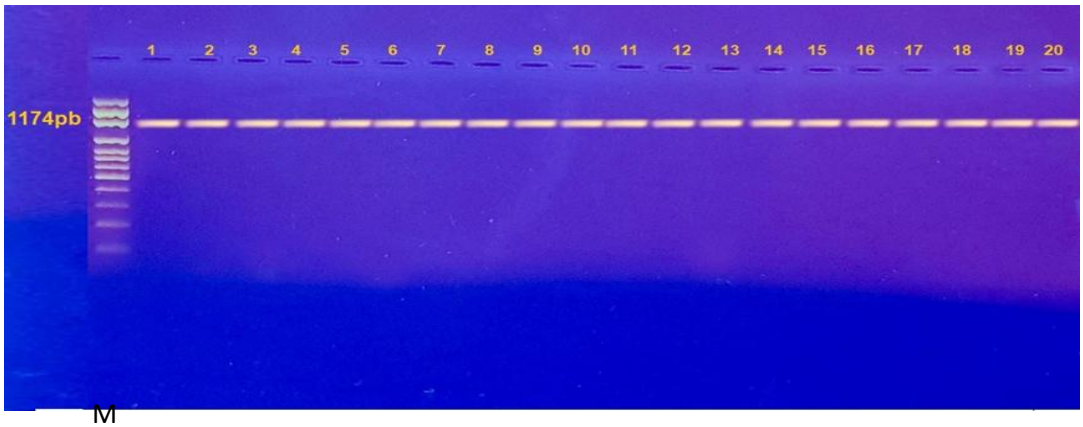
تم استخدام هذا النظام لتأكيد التشخيص النهائي لبكتريا *A.hydrophila* إذ تم الكشف عن البكتيريا بشكل أسرع وبعيداً عن التلوث الذي قد يمنع اكتشاف العامل الممرض ، وأكدت نتائج الاختبارات المستخدمة في هذا النظام التي تم الحصول عليها من الأختبارات الكيموحيوية ، إن جميع العزلات ال 26 هي بكتريا *A.*

hydrophila . اتفقت نتائج هذه الدراسة مع Elbehiry *et al*. (2019) في المملكة العربية السعودية اذ تم التعرف على عزلات *A. hydrophila* كيميائيًا وحيويًا بواسطة نظام Vitek® 2 Compact.

التشخيص الجزيئي بأستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل

Molecular diagnosis using polymerase chain reaction

تم إنتقاء 20 عزلة بكتيرية بواقع عزلة واحدة (1) للجروح Wound وعزلتين (2) للدم blood و7 عزلات للادرار Urin و10 عزلات للخروج Stool خضعت العزلات الى التشخيص الجزيئي بإستعمال تقنية (PCR) بأستخدام بادئات متخصصة ،ثم بعد ذلك تم برمجة جهاز ال PCR ورُحلت نواتج التفاعل على هلام الأكاروز(1 %) وتعريضها لجهاز الاشعة فوق البنفسجية وبذلك نحصل على ملف تعريف لتحديد أو تصنيف السلالة البكتيرية حيث تؤدي هذه التقنيات إلى كشف أسرع لبكتريا *A.hydrophila* دون الحاجة الى إستخدام العديد من الأوساط الزراعية كما إنها أقل عُرضة للتلوث فضلاً عن دقة تشخيص العينات المعزولة مقارنة بالطرق الأخرى ، شخصت بكتريا *A.hydrophila* بإستخدام الجين *16S rRNA gene*،الذي يكون ثابتا جينياً وقليل التغاير في النوع البكتيري إذ أظهرت نتائج الدراسة الحالية إحتواء 20 عزلة من بكتريا *A.hydrophila* على الجين التشخيصي *16S rRNA* الذي يمثل المورثة التشخيصية لهذه البكتريا (الشكل 4-6)، لوحظ ظهور حزم وراثية لجميع العزلات المرحلة ،ومستوى واحد وهذا يعطينا دلالة على إرتباط البادئ بالتسلسل المتمم له في شريط الـ DNA ،تتفق نتائج الدراسة الحالية مع Al-Fatlawy (2013) التي أظهرت جميع عزلاته نسبة تطابق 100% ، كذلك تتفق هذه النتائج مع دراسة Reichenberger *et al*.(2015) الذين أظهروا ان الجين التشخيصي موجود في جميع العزلات وبنسبة 100% ، كذلك تتفق هذه النتائج مع Othman *et al*.(2017) الذين وجدوا ان هذا الجين موجود في جميع العزلات ونسبة تطابق 100%

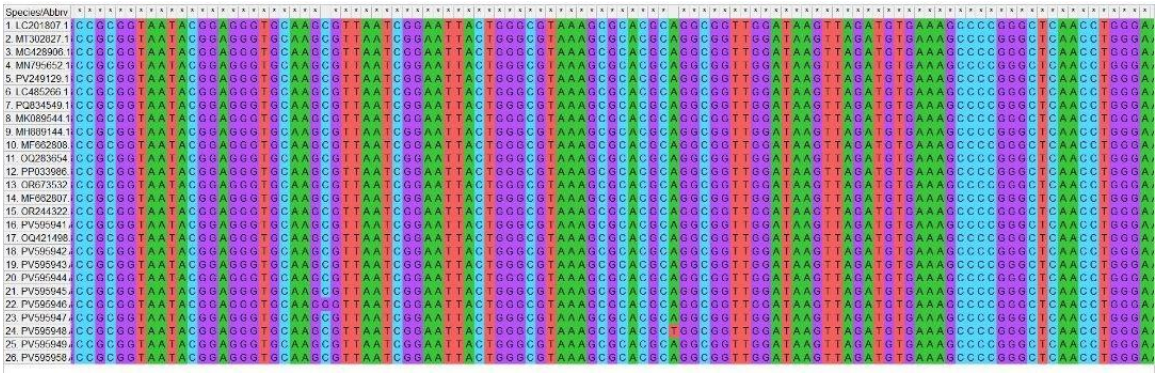


الشكل (4-6)التر حيل الكهربا ئي لهلام االاكار وز المستخدم بتركيز 1 غم والحاوي على نتائج فحص PCR لجين*16S rRNA* gene الخاص بتشخيص بكتيريا *A.hydrophila*, اذ يمثل M:Marker Ladder 3000-100 , والعزلات من (1-20) لبكتريا *A.hydrophila* الموجبة للفحص بناتج طوله 1174bp. باستخدام تيار 80 امبير و100فولت لمدة ساعة واحدة.

تشخيص العزلات باستخدام تقنية تسلسل الحامض النووي

Diagnosis of isolates using DNA sequencing technology

أظهرت نتائج التحليل لتسلسل الجين قيد الدراسة للحامض النووي وجود تطابق في تسلسل القواعد النتروجينية للجين*16S rRNA* بين عزلات بكتريا A.*hydrophila* المحلية وبين عزلات *A.hydrophila* العالمية المودعة في بنك الجينات (Genebank-NCBI) إذ كانت نسبة التطابق لخمسة عـزلات (100%) والعـزلات الأخـرى بنسبة تطابق (99%) ، أوضح Shin *et al.* (2015) بأنه يصعب تحديد هوية بكتيريا *A.hydrophila* بالطرق الكيميائية الحيوية، إذ يُمكن الخلط بينها بسهولة مع مُخمِّرات أخرى إيجابية الأوكسيديز *Vibrio* و*Plesiomonas* وقد تم تكييف تسلسل جينات *16S rRNA* على نطاق واسع لتحديد هوية البكتيريا؛ ومع ذلك، فإن جنس *Aeromonas* يتألف من مجموعات جينية متشابهة للغاية، حيث اختلفت الأنواع فقط ببضعة نيوكليوتيدات، مماجعل تحديدها صعبًا، فمن بين 65 عزلة ، تم تحديد 35 عزلة من *A. hydrophila*، و23 عزلة من *A. caviae*، و6 عزلات من *A. veronii*، وعزلة واحدة من *A. aquariorum* على مستوى النوع، وقد اعزى الباحث الى ان هذا نتيجةً قد تعود للتنوع الظاهري الكبير ضمن أنواع *Aeromonas*، حيث استُخدم تسلسل *16S rRNA* على نطاق واسع لتحديد العزلات السريرية في المختبرات الحديثة، وبذلك جاءت نتائج هذه الدراسة مقاربة مع (Abdulhasan *et al.* (2019 في بغداد الذين وجـدوا ان الجين *16S rRNA*الخـاص بتشخيص بكـتريا *A.hydrophila* يتطابق بنسبة أكثر من 99% عند تحليلها بموقع analysis BLAST-NCBI ، وكذلك وجد نفس الباحث ان تحليل الشجرة الوراثية (Phylogenetic tree) للجين*16S rRNA* ، اظهر تطابقاً عالي جداً مع 20 سلالة من بكتريا *A.hydrophila*العالمية في بنك الجينات وكانت نسبة التطابق 98.9 - 99.7 % وهذه مقاربة مع نتيجة تحليل الشجرة الوراثية للدراسة الحالية إذ كانت العزلات متطابقة بنسبة (100%) للجين *16S rRNA* .



تحليل تسلسل الاصطفاف النيوكليوتيدي لجين *16S rRNA* لبكتريا *A.hydrophila* المحلية مع العزلات العالمية المسجلة في NCBI-BLAST.

مضادات الكوينولينات Quinoline antibiotic

سجلت الدراسة الحالية نسب مقاومة عالية بين عزلات بكتيريا *A.hydrophila* لمضادات الكوينولينات والتي عرفت بفعاليتها العالية تجاه هذه البكيتريا ،اذ تمنع تكوين الحامض النووي ال DNA أظهرت النتائج نسبة مقاومة تجاه المضاد الحيوي سبروفلوكساسين حيث بلغت 84.6 %بين العزلات قيد الدراسة وبذلك لا تتفق هذه النتائج مع دراسة Abu-Elala *et al.*,(2015) الذين اجروا دراستهم على الدجاج وعلاقته بإمراضية الانسان حيث لم تبدي البكتريا أي مقاومة تجاه المضاد حيث أظهرت هذه البكتيريا حساسية تامة تجاه السيبروفلوكساسين ،في حين تتفق نتائج هذه الدراسة مع ماتوصل اليه Skwor *et al.* (2014) الذين وجدوا ان نسبة المقاومة لمضاد السيبروفلوكساسين بلغت (80.8%) ، ولاتتفق مع Fauzi *et al.* (2021) الذي أظهرت نتائجهم نسبة مقاومة لمضاد السيبروفلوكساسين بلغت (9.8%)أما مضاد ليفوفلوكساسين فقد أبدت جميع العزلات مقاومة بنسبة بلغت 100% ،اذ يمكن لهذا المضاد الحيوي أن يُعطّل غشاء البكتيريا

السالبة بالتفاعل مع عديد السكاريد الشحمي السطحي، ويُستخدم كملاذ أخير للعدوى التي تسببها الكائنات الدقيقة المقاومة للأدوية المتعددة (Gonzalez *et al*.,2021) .

مضادات السيفالوسبورينات Cephalosporine antibiotics

أظهرت الدراسة الحالية إن نسب المقاومة التي ابدتها عزلات *A.hydrophila* تجاه الجيل الثالث من السيفالوسبورينات المتمثلة بمضاد السيفتاديزيم بنسبة 100% وبذلك جاءت نتائج هذه الدراسة غير متوافقة مع نتائج Yang *et al*. (2019) الذين سجلوا نسبة مقاومة للمضاد بلغت 52.1% .

مضاد التتراسايكلين Tetracycline antibiotic

سجلت الدراسة مقاومة للتتراسايكلين بنسبة76.9% ،وهي اعلى مما توصل اليه Dhanapala *et al*. (2021) حيث بلغت مقاومة المضاد 23.6% ، في حين Thaotumpitak *et al*. (2023) سجل مقاومة للمضاد بلغت 26.7 % ،ولاتتفق مع(2019)Zhou *et al*. الذين سجلوا نسبة مقاومة للمضاد بلغت 18.3 % تعمل التتراسايكلينات على منع تخليق البروتين عن طريق منع ارتباط aminoacyl-tRNA بموقع المستقبل الريبوسومي (A)، غالبًا ما تنجم مقاومة التتراسيكلين أما عن اكتساب جينات جديدة، تُشفّر تدفق التتراسيكلين المعتمد على الطاقة، ترتبط العديد من هذه الجينات بالبلازميدات المتحركة أو الترانسبوزونات أو تُغيّر نفاذية مسام الغشاء الخارجي أو عديدات السكاريد الدهنية فيه، أو التحلل الانزيمي للتتراسايكلين في الخلية البكتيرية ، أو تُغيّر الحمض النووي الريبوزي الريبوسومي. (Gasparrini *et al*.,2020).

مضاد الكلورامفينيكول Chloramphenicol antibiotic

سجلت الدراسة الحالية مقاومة عالية لمضاد الكلورامفينيكول بلغت 96.2% ، وهذه النتائج لاتتفق مع Salah *et al*. (2021) الذي أظهرت عزلاته مقاومة بلغت 67.4 %، ، وأن الكلورامفينيكول قد يكون فعالاً ضد بكتيريا *A. hydrophila*، إلا أنه من المهم ملاحظة أن المقاومة قد تتطور، خاصةً في حالات مقاومة المضادات الحيوية المتعدد ، اذ يُعد الكلورامفينيكول مضادًا حيويًا واسع الطيف، وغالبًا ما يُنصح بإعطائه بجرعات منخفضة نظرًا لآثاره الجانبية المحتملة على كل من الحيوانات والبشر ولا تتفق مع Zhou *et al*.(2019) الذين وجدوان النسبة المقاومة لمضاد الكلورامفينيكول 8.7 %.

مضاد السلفونـاميد Sulfonamide antibiotic

سجلت الدراسة الحالية لمضاد الترايميثوبرايم بنسبة 80.8% ، وهذه النتيجة لا تتفق مع دراسة Sherif & Kassab(2023) اللذان سجلا مقاومة للمضاد بنسبة 100 % ومع Adah *et al*. (2024) الذي سجل مقاومة للمضاد 63.5% ، وهي اعلى من Thaotumpitak *et al*. (2023)الذي سجل مقاومة بنسبة 27.6 % ،ولا تتفق مع Zhou *et al*.(2019) الذين سجلوا نسبة مقاومة للمضاد بلغت5.2%،

مضادات الماكروليدات Macrolides antibiotics

سجلت الدراسة الحالية مقاومة عالية لمضاد الاريثرومايسين بلغت 92.3% وهي أعلى من دراسة(2021) Dhanapala *et al*. الذين اختاروا 8 عزلات من بكتريا *A.hydrophila* واختبر مقاومتها للمضادات الحيوية حيث سجل المقاومة لبكتريا *A.hydrophila* تجاه نفس المضاد(53.3%) وكانت نسبة المقاومة لبكتريا *A.hydrophila*اعلى من *A. caviae* و*A. dhakensis* بينما كانت نتائج هذ الدراسة متوافقة مع نتائج Elsherif *et al*. (2023) الذين اظهرت عزلاتهم نسبة مقاومة عالية لمضاد الاريثرومايسين بلغت (91.7%) ، ولا تتفق نتائج الدراسة الحالية مع Mulia *et al*. (2021) الذين وجدوا ان نسبة المقاومة لمضاد الارثرومايسين 70 %، ،حين لم تسجل نتائج الدراسة الحالية أي مقاومة لمضاد

الكلارثرومايسين، الذي قد ترجع مقاومة البكتريا لهذه المضادات الى عده اليات منها تثبيط عملية دخول المضاد الى داخل الخلية البكتيرية ، او عن طريق المقاومة التي تتوسطها البلازميدات ، (Tang & Zhao, 2023).

المصادر

Fernández-Bravo, A., & Figueras, M. J. (2020). An update on the genus Aeromonas: taxonomy, epidemiology, and pathogenicity. *Microorganisms*, 8(1).

Navarro, A., & Martínez-Murcia, A. (2018). Phylogenetic analyses of the genus Aeromonas based on housekeeping gene sequencing and its influence on systematics. *Journal of applied microbiology*, 125(3): 622-631.

Elbehiry A, Marzouk E, Abdeen E, Al-Dubaib M, Alsayeqh A, Ibrahem M, Hamada M, Alenzi A, Moussa I, Hemeg HA. 2019. Proteomic characterization and discrimination of Aeromonas species recovered from meat and water samples with a spotlight on the antimicrobial resistance of Aeromonas hydrophila. *MicrobiologyOpen* 8:1–14.

Wahid, M. F., Hasan, M. J., Alom, M. S., & Mahbub, S. (2019, July). Performance analysis of machine learning techniques for microscopic bacteria image classification. In 2019 10th *International Conference on Computing, Communication and Networking Technologies (ICCCNT)*. IEEE.

Semwal, A., Kumar, A., & Kumar, N. (2023). A review on pathogenicity of Aeromonas hydrophila and their mitigation through medicinal herbs in aquaculture. *Heliyon*, *9*(3).

Hashim, S. T., & Nema, M. M. (2018). Study of some virulence factors of Aeromonas Spp. isolated from stool samples of children with diarrhea. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*, *42*(1), 23-27.

Al-Maleky, G. M. (2013). Survey of Aeromonas hydrophila in three marine fish species from north west Arabian Gulf, Iraq. University of Thi-Qar Journal of Science, 3(4).

Pauzi, N. A., Mohamad, N., Azzam-Sayuti, M., Yasin, I. S. M., Saad, M. Z., Nasruddin, N. S., & Azmai, M. N. A. (2020). Antibiotic susceptibility and pathogenicity of Aeromonas hydrophila isolated from red hybrid tilapia (Oreochromis niloticus× Oreochromis mossambicus) in Malaysia. *Veterinary world*, *13*(10), 2166.

Abo-Shama, U. H., El Raheem, A. A. A., Alsaadawy, R. M., & Sayed, H. H. (2025). Phenotypic and genotypic characterization of Aeromonas hydrophila isolated from freshwater fishes at Middle Upper Egypt. *Scientific Reports*, 15(1)

Lenchenko, E., Lenchenko, S., Sachivkina, N., Kuznetsova, O., & Ibragimova, A. (2022). Interaction of Cyprinus carpio Linnaeus with the biofilm-forming Aeromonas hydrophila. *Veterinary World*, *15*(10), 2458.

Hunt, L. K., Overman, T. L., & Otero, R. B. (1998). Rapid oxidase method for testing oxidase-variable Aeromonas hydrophila strains. *Journal of Clinical Microbiology, 13(6), 1117-1118*

Wejdan, R. T. A., Al-Rubaiae, A. F., Oruba, K. H. A., & Noor, S. N. (2014). PCR detection of putative hemolysin and aerolysin genes in an Aeromonas hydrophila isolates from diarrhea in Babylon Province. Journal of Natural Sciences Research, 4, 41-47.

Pritom, M. H. (2022). In Vitro CHARACTERIZATION OF GUT STRESS TOLERANT POTENTIAL PROBIOTIC Lactobacillus spp. ISOLATED FROM TRADITIONAL CURDS (*Doctoral dissertation, KHULNA UNIVERSITY*.

Reichenberger, E.R., Rosen, G., Hershberg, U. and Hershberg, R. 2015. Prokaryotic Nucleotide Composition Is Shaped by Both Phylogeny and the Environment. *Genome Biol Evol*., 7(5): 1380– 1389.

Othman, R. M., Al-Thahe, F. S., Faaz, R. A. and Jassim, H. Y. 2017. Molecular detection of Aeromonas hydrophila isolated from infected carp Cyprinus carpio during in aquafarming in Basra, Iraq. *Life Science Archives*, 3(2): 974-980.

Al-Fatlawy, H. N. K., & Al-Ammar, M. H. (2013). Molecular study of Aeromonas hydrophila isolated from stool samples in Najaf (Iraq). *International Journal of Microbiology Research*, *5*(1), 363.

Shin, H. B., Yoon, J., Lee, Y., Kim, M. S., & Lee, K. (2015). Comparison of MALDI-TOF MS, housekeeping gene sequencing, and 16S rRNA gene sequencing for identification of Aeromonas clinical isolates. *Yonsei medical journal*, 56(2), 550.

Abdulhasan, G. A., Alattar, N. S., & Jaddoa, N. T. (2019). Comparative study of some virulence factors and analysis of phylogenetic tree by 16S rDNA Sequencing of Aeromonas hydrophila isolated from clinical and environmental samples. *Iraqi Journal of Science*, 2390-2397.

Skwor, T., Shinko, J., Augustyniak, A., Gee, C., & Andraso, G. (2014). Aeromonas hydrophila and Aeromonas veronii predominate among potentially pathogenic ciprofloxacin-and tetracycline-resistant Aeromonas isolates from Lake Erie. *Applied and environmental microbiology*, *80*(3), 841-848.

Abu-Elala, N., Abdelsalam, M., Marouf, S., & Setta, A. (2015). Comparative analysis of virulence genes, antibiotic resistance and gyrB-based phylogeny of motile Aeromonas species isolates from Nile tilapia and domestic fowl. *Letters in applied microbiology*, *61*(5), 429-436.

Fauzi, N. N. F. N. M., Hamdan, R. H., Mohamed, M., Ismail, A., Zin, A. A. M., & Mohamad, N. F. A. (2021). Prevalence, antibiotic susceptibility, and presence of drug resistance genes in Aeromonas spp. isolated from freshwater fish in Kelantan and Terengganu states, Malaysia. *Veterinary world*, *14*(8), 2064.

Gonzalez-Avila, L. U., Loyola-Cruz, M. A., Hernández-Cortez, C., Bello-López, J. M., & Castro-Escarpulli, G. (2021). Colistin resistance in Aeromonas spp. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(11), 5974.

Yang, S., He, T., Sun, J., & Sun, S. (2019). Distinct antimicrobial resistance profiling of clinically important Aeromonas spp. in southwest China: a seven-year surveillance study. *Infection and drug resistance*, 2971-2978.

Dhanapala, P. M., Kalupahana, R. S., Kalupahana, A. W., Wijesekera, D. P. H., Kottawatta, S. A., Jayasekera, N. K., ... & Jagoda, S. D. S. (2021). Characterization and antimicrobial resistance of environmental and clinical Aeromonas species isolated from fresh water ornamental fish and associated farming environment in Sri Lanka. *Microorganisms*, *9*(10), 2106.

Thaotumpitak, V., Sripradite, J., Atwill, E. R., & Jeamsripong, S. (2023). Emergence of colistin resistance and characterization of antimicrobial resistance and virulence factors of Aeromonas hydrophila, Salmonella spp., and Vibrio cholerae isolated from hybrid red tilapia cage culture. *PeerJ*, *11*, e14896.

Zhou, Y., Yu, L., Nan, Z., Zhang, P., Kan, B., Yan, D., & Su, J. (2019). Taxonomy, virulence genes and antimicrobial resistance of Aeromonas isolated from extra-intestinal and intestinal infections. *BMC infectious diseases*, *19*(1).

Gasparrini, A. J., Markley, J. L., Kumar, H., Wang, B., Fang, L., Irum, S., ... & Dantas, G. (2020). Tetracycline-inactivating enzymes from environmental, human commensal, and pathogenic bacteria cause broad-spectrum tetracycline resistance. *Communications biology*, 3(1), 241.

Saleh, A., Elkenany, R., & Younis, G. (2021). Virulent and multiple antimicrobial resistance Aeromonas hydrophila isolated from diseased Nile tilapia fish (Oreochromis niloticus) in Egypt with sequencing of some virulence-associated genes. *Biocontrol science*, *26*(3), 167-176.

Sherif, A. H., & Kassab, A. S. (2023). Multidrug-resistant Aeromonas bacteria prevalence in Nile tilapia broodstock. *BMC microbiology*, *23*(1), 80.

Adah, D. A., Saidu, L., Oniye, S. J., Adah, A. S., Daoudu, O. B., & Ola-Fadunsin, S. D. (2024). Molecular characterization and antibiotics resistance of Aeromonas species isolated from farmed African catfish Clarias gariepinus Burchell, 1822. BMC Veterinary Research, 20(1), 16.

Elsherif, M. F., Saad, S. M., Hamad, A., & Amin, R. A. (2023). Prevalence and antibiotic resistance patterns of Aeromonas and Pseudomonas species recovered from aquatic foods sold at the retail market in Egypt. Benha Veterinary Medical Journal, 45(1), 146-151.

Tang, K., & Zhao, H. (2023). Quinolone antibiotics: resistance and therapy. *Infection and drug resistance*, 811-820.

Mulia, D. S., Isnansetyo, A., Pratiwi, R., & Asmara, W. (2021). Antibiotic resistance of Aeromonas spp. isolated from diseased walking catfish (Clarias sp.). *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, *22*(11).