مجلة القادسية للعلوم الصرفة المجلد 19 العدد 3 سنة 2014
ISSN 1997-2490 صفاء منعم \أزهار نوري

*عزل وتشخيص بكتريا *Aeromonas sp.* من مصادر سريريه وبيئية (مياه) ودراسة حساسيتها للمضادات الحيوية

صفاء منعم سلمان أزهار نوري حسين

جامعة القادسية / كلية التربية / قسم علوم الحياة

Az.almousawi@yahoo.com

الخلاصة:

تضمنت هذه الدراسة جمع 259 عينة من مصادر سريريه مختلفة لمرضى راقدين في مستشفيات مدينة الديوانية، و كذلك بيئيـة (مياه) للفترة من 2012/11/10 ولغاية 10 /3 /2013 بينت نتائج الاختبارات المظهرية والكيموحيوية والعدة التشخيصيةAPI 20 E وجهاز الفايتك عائديه 17 عزلة بكتيرية لجنس *Aeromonas*شخصت هذه العزلات إلى مستوى النوع إذ شخصت 8 عزلاتتعود للنوع*Aeromonashydrophila*، و 4 عزلات للنوع *Aeromonassobria* ، ، و 4 عزلات للنوع *Aeromonascaviae* ، وعزلة واحدة للنوع *Aeromonassalmonicida* ، اختبرت حساسية العزلات تجاه 10 مضادات حيوية ، تباينت استجابة البكتريا قيد الدراسة لهذه المضادات حيث كانت 76,47 %مقاومة للـ PenicillinG ، و82,35 % مقاومة للـ Clindamycin، كما أظهرت17,64 % مقاومة لمضاد Chloramphenicol، بينما كانت 100% حساسة للـ Imipenem و Meropenem و Ciprofloxacin و Amikacin ، فيما أظهرت نسب حساسية مختلفة لمضادات Gentamicin و Cefotaxime و Ceftriaxone (88,23% و 70,58% و76,47%) على التوالي 0

المقدمة

الأيروموناس بكتريا واسعة الانتشار في الطبيعة يمكن عزلها من العديد من المواطن البيئية ، كالمياه السطحية (العذبة ، المصبات و البحرية) ومياه المجاري والمياه المعدنية الطبيعية والمياه الراكدة ومياه الشرب المكلورة وغير المكلورة وبرك الأسماك ، كما يمكن عزلها من التربة والأغذية البحرية والأغذية الملوثة المبردة أو المجمدة ذات الأصل الحيواني وكذلك من الإنسان [1و2و3] وهي سالبة لصبغة غرام ، موجبة للأوكسيديز ، لا هوائية اختيارياً ، مخمرة للكلوكوز ، عصوية الشكل أو مستقيمة ، ذات نهاية مدورة ، أبعادها3.5-1.0 x 1.0-0.3 مايكروميتر ، تشاهد بصورة منفردة أو على هيئة أزواج ونادرا ما تكون على هيئة سلاسل قصيرة ، الأنواع المتحركة تنتج سوط قطبي مفرد ، على الرغم من أن الأسواط الجانبية والمحيطية ممكن أن تتكون على الأوساط الصلبة لبعض الأنواع[4و5] والأيروموناس عزلت بوتيرة متزايدة في الفصول الدافئة (مايو إلى أكتوبر في نصف الكرة الشمالي) [6و10]0

صُنف جنس الأيروموناس في البداية ضمن عائلة Vibrionaceae إلا أن تحليلات النشوء والتطور والأدلة الجزيئية أشارت إلى أنه ليس وثيق الصلة بالضمات لذلك فقد وضعفي منتصف عام 1980تحت عائلة مستقلة هي Aeromonadaceace ،حيث تم تقسيم هذا الجنس إلى مجموعتين رئيسيتين اعتمادا على درجة حرارة نموها والحركة وإنتاج الصبغات [5و7] ، المجموعة الأولى تدعى بآلفة الحرارة المعتدلة وهذه تنمو عند 37مْ ، متحركة وغير مكوّنة للصبغات ، أما المجموعة الأخرى فتدعى آلفة البرودة ، غير متحركة ومكوّنة للصبغات [8و9] ، بشكل عام فأن أعضاء جنس الأيروموناس تقسم إلى ثلاث أنواع متميزة كيماويا وحيوياً وهي *Aeromonashydrophila*،*Aeromonassobria*and*Aeromonascaviae*[10] ، تنمو هذه البكتريا بشكل مثالي في مدى حراري يتراوح بين 22 و 35 مْ ، إلا أن النمو ممكن أيضاً أن يلاحظ عند 0- 45 مْ في أنواع قليلة ، كما أن بعض الأنواع مثل سلالات *A. salmonicida* لا تنمو عند 35 مْ ، جميع أنواع الأيروموناس تقاوم الأس الهيدروجيني الذي يتراوح 5,5 – 9 ، أما التركيز المثالي لكلوريد الصوديوم فيتراوح بين 0 – 4 % [11و12و13]0

- **البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول**

تسبب هذه البكتريا مدى واسع من الحالات المرضية بين الحيوانات من ذوات الدم الدافئ والبارد والتي تتضمن الأسماك ، الزواحف، البرمائيات ، الثدييات، كما تصيب البشر[14]وتسبب الإسهال خصوصا في الدول النامية التي يكون فيهاالإسهال سبب مهم جدا في أمراضية وموت الأطفال والرضع [15]كما تسبب التهاب الجروح وتسمم الدم و السرطان وتليف الكبد والتهاب الجهاز البولي والتهاب السحايا والتهاب البريتون والتهاب الشغاف وكذلك أمراض الكبد والسكر والأمراض الكلوية وغيرها [16و17]0

تُظهر أنواع الأيروموناس اختلافات في حساسيتها أو مقاومتها للمضادات الحيوية [18] أن مقاومة المضادات الحيوية في هذه البكتريا يتم عادة عن طريق الكروموسومات ، إلا أن إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز من قبل هذه البكتريا يشفر له بواسطة البلازميدات [19و20] أو الأنتكرونات [21] ، هذه الأنزيمات تكون فعالة ضد معظم مضادات البيتالاكتام مثل cefepime وبقية السيفالوسبورينات ذات الطيف الواسع [22] 0أن الغرض من هذه الدراسة هو عزل بكتريا الأيروموناس من حالات سريريهمختلفة لبيان دورها في أمراضية الإنسان وكذلك من المياه لكونها مصدرا مهما من مصادر انتقال العدوى بالبكتريا للإنسانبالإضافة إلى تحديد أنواع المضادات الحيوية التي يمكن استعمالها ضد بكتريا الأيروموناس للقضاء عليها أو الحد من انتشارها 0

المواد وطرائق العمل

جمع العينات :

جمعت 259 عينــة تتضمن233 عينة من مصادر سريريه مختلفة لمرضى راقدين في مستشفى الديوانية للنسائية والأطفـال و مستشفى الديوانيـة العـام، و 26 عينة من مصادر بيئيـة (مياه) للفترة من 2012/11/10 ولغاية 10 /3 / 2013 باستخدام أنابيب وحاويات بلاستيكية معقمة 0نقلت العينات إلىمختبر مستشفى الديوانية للنسائية والأطفال لغرض زرعها على الأوساط الزرعية المناسبة 0

طريقة الزرع :

لقحت العينات في وسط ماء الببتون القاعدي Alkaline Pepton Water (APW) (BDH, England) وحضنت هوائياً عند درجة حرارة 35 – 37 مْ لمدة 24 ساعة ، أخذ ملء الناقل المعقم من المزارع النامية وزرعت على وسط Thiosulfate-citrate-bile salts - sucrose agar (T.C.B.S)(Himedia , India)وحضنت الأطباق هوائياً عند درجة حرارة 35-37 مْ لمدة 24 ساعة حيث ظهرت بعض المستعمرات بلون أصفر على هذا الوسط ، بعدها أخذت المستعمرات الصفراء وأعيد زرعها على وسط ماكونكي أكارMacconkey agar(BDH, England)وحضنت الأطباق هوائياً عند درجة حرارة 35-37 مْ لمدة 24 ساعة0

عزل بكتريا الأيروموناس :

اعتمدت عملية العزل على التشخيص المظهري للمستعمرات وكذلك على الاختبارات الكيموحيوية باستخدام العدة التشخيصية API 20 Eوجهازالفايتكوحسب ما ذكره (5 و 12) 0

التشخيص المظهري :

شخصت البكتريا مظهريا من خلال استخدام المجهر الضوئي بعد تصبيغها بصبغة غرام ، ومن خلال صفات المستعمرة على الأوساط الزرعية المختلفة من حيث شكل المستعمرة وارتفاعها وحافاتها ولونها وكذلك نوع التحلل الذي تحدثه في الدم 0

الاختبارات الكيموحيوية :

أجريت عدد من الاختبارات الكيموحيوية على المستعمرات المعزولة والنامية على وسط Neutrient agar لمدة 24- 48 ساعة عند درجة حرارة 37 مْ والتي شملت اختبارات Oxidase ، Catalase ، indole, citrate ،methyl red ،Voges-proskauer ، Kligler Iron Agar (KIA) ، بالإضافة إلى تخمير اللاكتوز باستخدام وسط MacConkey agar و تحلل الأسكولين وكذلك نوع التحلل (β or □)الذي تحدثه على وسط أكار الدم 0

التشخيص باستخدام API 20 E و جهاز الفايتك :

بسبب تشابه بكتريا الأيروموناس مع أفراد العائلة المعوية في كثير من الخصائص و للتأكد من صحة التشخيص الأولي استخدمت العدة التشخيصية API 20 E (bioMerieux , France)، كما أستخدم جهاز الفايتكVitek 2 Compact (bioMerieux , USA) والتي من خلالها شخصت العزلات بدقة أكبر 0

اختبار الحساسية للمضادات الحيوية :

اجري فحص حساسية بكتريا الأيروموناس للمضادات الحيوية على وسط Mueller Hinton agar باستخدام طريقة انتشار الأقراص المشبعة تبعاً لتعليمات National Committee for Clinical Laboratory standards (NCCLS,2002) اختبرت حساسية العزلات تجاه 10 مضادات حيوية وهي : Penicillin G (P) , 10 IU و Ceftriaxone (CRO) , 30 µg و Cefotaxime (CTX) , 30 µg و Imipenem (IMP) , 10µgالمنتجة من قبل (Oxoid, USA)و Meropenem (MEM) , 10 µgو Amikacin (AK), 30 µg و Gentamicin (CN) , 10 µg و Clindamycin (DA) , 10 µg و Ciprofloxacin (CIP) , 5 µg و Chloramphenicol (C) , 30 µgالمنتجة من قبل (BioAnalyse, Turkey) ، حضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 18 ساعةومن ثم تم قياس أقطار مناطق التثبيط حول كل قرص من أقراص المضادات الحيوية بواسطة المسطرة ، و قورنت مع الجداول القياسية الخاصة بتقرير [23] 0

النتائج والمناقشة :

التشخيص و العزل :

تم التحري عن وجود بكتريا *Aeromonas sp.* في 259 عينة شملت233 عينة سريريه (خروج ، إدرار ، جروح ، حروق) من مرضى راقدين في مستشفى النسائية والأطفال و مستشفى الديوانية العام و 26 عينة بيئية (مياه) جمعت من نهر الديوانية والسواقي والآبار الارتوازية بالإضافة إلى مياه الحنفية، جدول (1) ، استخدمت عدة أوساط زرعيه لعزل بكتريا الأيروموناس من العينات التي تم الحصول عليها ، حيث استخدم وسط ماء الببتون القاعدي باعتباره وسطاً أغنائيا يشجع ويدعم نمو البكتريا المستخدمة في هذه الدراسة فضلاً عن كون قاعدية هذا الوسط pH = 8.6 - 9.8 تثبط نمو العديد من الأحياء المجهرية ، حيث يمكنه تثبيط نمو العديد من البكتريا المعوية مما يزيد فرصة نمو وتكاثر البكتريا قيد الدراسة حتى لو وجدت بأعداد قليلة وبالتالي زيادة فرص تشخيصها [24] ، كما استخدم وسط Thiosulfate-Citrate-Bile salts-Sucrose agar (T.C.B.S) كوسط انتقائي Differential medium يمكن من خلاله تمييز البكتريا قيد الدراسة من ألوانها حيث ظهرت مستعمرات هذه البكتريا على هذا الوسط بلون أصفر بسبب قدرة البكتريا على تخمير سكر السكروز Sucrose المكوّن الأساسي في الوسط مما يؤدي إلى إنتاج حوامض إلى الوسط وبالتالي تغيير دالة الأس الهيدروجيني للوسط نحو الحامضية وتغير لون الوسط من اللون الأخضر إلى الأصفر [25] ، أخذت المستعمرات الصفراء النامية على وسط (T.C.B.S) وزرعت على وسط أكار ماكونكي MacConkey agar باعتباره وسط زرعي انتخابي وتفريقي في نفس الوقت حيث يثبط نمو البكتريا الموجبة لصبغة غرام بسبب احتوائه على أملاح الصفراء وصبغة البنفسج البلوري ، كما يمكن من خلاله التفريق بين البكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز عن تلك غير المخمرة ، وقد ظهرت مستعمرات بكتريا *Aeromonas sp.* شاحبة pale على هذا الوسط بسبب عدم قدرة أغلب هذه البكتريا على تخمير سكر اللاكتوز Lactose Non Fermentation of المكوّن الأساسي في هذا الوسط [26] 0

أستخدم وسط أكار الدم لدراسة قدرة بكتريا الأيروموناس على تحليل الدم ، حيث أظهرت أغلب العزلات قدرة على تحليل الدم تحليلاً كاملاً (β- Haemolysis) ، حيث تكون المستعمرات محاطة بهالة شفافة ، في أظهرت بعض العزلات الأخرى تحليلاً جزئياً للدم (□□□□□□aemolysis) ، حيث تكون المستعمرات محاطة بلون أخضر ، كما أن هذا الوسط يمتاز بعدم احتوائه على السكريات التي عدم نمو بعض أنواع البكتريا حيث أن بعض أنواع السكريات مثل اللاكتوزو الزايلوز تعتبر عوامل مثبطة لنمو بعض الأنواع [27] 0

الجدول (1) : أعداد عزلات الأيروموناس ونوع العينة المعزولة منها

العينة		عدد العزلات	الكلي	العينة		الكلي	عدد العزلات
نوعها	مكان الجمع			نوعها	مكان الجمع		
بيئية (مياه)	شط الديوانية	6	14	سريرية	خروج	160	8
	سواقي	2	5		إدرار	35	-
	آبار ارتوازية	1	2		جروح	20	-
	مياه الحنفية	0	5		حروق	18	-
	المجموع	9	26		المجموع	233	8

*لا يوجد فرق معنوي بين نسب العزل للعزلات البيئية والسريرية عند مستوى احتمالية 5%

ظهرت مستعمرات الأيروموناس وردية إلى حمراء اللون بعد تصبيغها بصبغة غرام (سالبة لصبغة غرام) ، وعند فحصها تحت المجهر الضوئي وباستخدام العدسة الزيتية ظهرت هذه البكتريا عصوية الشكل ذات نهايات مدورة ، على هيئة خلايا مفردة أو على هيئة أزواج ولم تلاحظ على هيئة سلاسل [26] 0

أجريت الاختبارات الكيموحيوية على المستعمرات المعزولة للتأكد من عائديتها لجنس *Aeromonas*واستبعاد الأجناس البكتيرية الأخرى التي تتشابه مع هذه البكتريا بالصفات المظهرية والكيموحيوية ، جدول (2) ، من أهم الاختبارات الكيموحيوية هو اختبار الأوكسيديز الذي يستخدم للكشف عن قدرتها على إنتاج إنزيمات السايتوكـــروم اوكسيديز Cytochrome oxidase enzymes، حيـــث اختبرت المستعمرات النامية على وسط MacConkey agarتجاه كاشف الأوكسيديز (رباعي مثيل بارا فنيلين ثنائي أمين ثنائي هيدروكلورايد) فتلوّنت جميعها باللـــون الأرجوانـــي (نتيجة موجبة) خلال 5-10 ثواني [25] ، ويعتبر هذا الاختبار مهم لتميز بكتريا الأيروموناس عن أفراد العائلة المعوية ، حيث تكون بكتريا الأيروموناس قادرة على إنتاج هذا الأنزيم 0

زُرعت المستعمرات علـــى وســـط أكـــار كلكلر Kligler agar وذلك للكشف عن قدرة البكتريا على تخمير السكريات الثنائية (الكلوكوز واللاكتوز) ، وإنتاج غاز CO2 وكبريتيد الهيدروجين H2S ، كانت نتيجة جميع العزلات K/A (الجزء المائل slant أحمر اللون (قاعدي) والجـــزء السفلي bottom أصفر اللون (حامضي)) ، بينما تباينت قدرتها على إنتاج غاز CO2 وتكوين كبريتيد الهيدروجين H2Sو تعتبر هذه الطريقة مفيـــدة للتمييز بيـــن بكتريـــا *Pseudomonas sp.* و *Aeromonas sp.* حيث أن بكتريا *Aeromonas sp.* تستطيع تخمير الكلوكوز لاهوائياً منتجة بذلك حامض وأحياناً حامض وغاز وبذلك تكون K/Aفي حين لا تتمكن بكتريا*Pseudomonas sp.* القيام بعملية تخمير السكريات ولا تنتج حامض وبذلك فهي تبقى K/K[28] ، كما أجريت بقيـــة الاختبارات الكيموحيويـــة على المستعمرات الموجبة للأوكسيديز والتي كان اختبار كلكلر لها (K/A)فجاءت النتائج كما هو موضح بالجدول (2) 0

جدول (2) الأختبارات الكيموحيوية لأنواع الأيروموناس قيد الدراسة

NO.	TEST	*A.hydrophila*	*A.caviae*	*A.sobria*	*A.salmonicida*
1	Oxidase	+Ve	+Ve	+Ve	+Ve
2	Catalase	+Ve	+Ve	+Ve	+Ve
3	kligler	K/A (G+)	K/A (G-)	K/A (Gv)	K/A (G+)
4	Urease	- Ve	- Ve	- Ve	- Ve
5	Indol	+Ve	+Ve	+Ve	+Ve
6	Simon Citrate *	+Ve	+Ve	+Ve	+Ve
7	VP	+Ve	- Ve	- Ve	+Ve
8	MR	V	- Ve	- Ve	- Ve
9	Esculin	+Ve	+Ve	- Ve	+Ve
10	H2S Production	V	- Ve	+Ve	- Ve
10	Motility	+Ve	+Ve	+Ve	- Ve
11	B-Haemolysis	V	+Ve	V	+Ve
12	Fermentation of lactose	- Ve	V	- Ve	- Ve

variable = V ، negative =**- Ve** ، positive =**+Ve**
، vogesproskauer = VP ، Methyl red = MR
، Alkaline/Acid without gas = (G-)K/A
، Alkaline/Acid with gas = (G+)K/A
Alkaline/Acid & variable for gas = (Gv)K/A

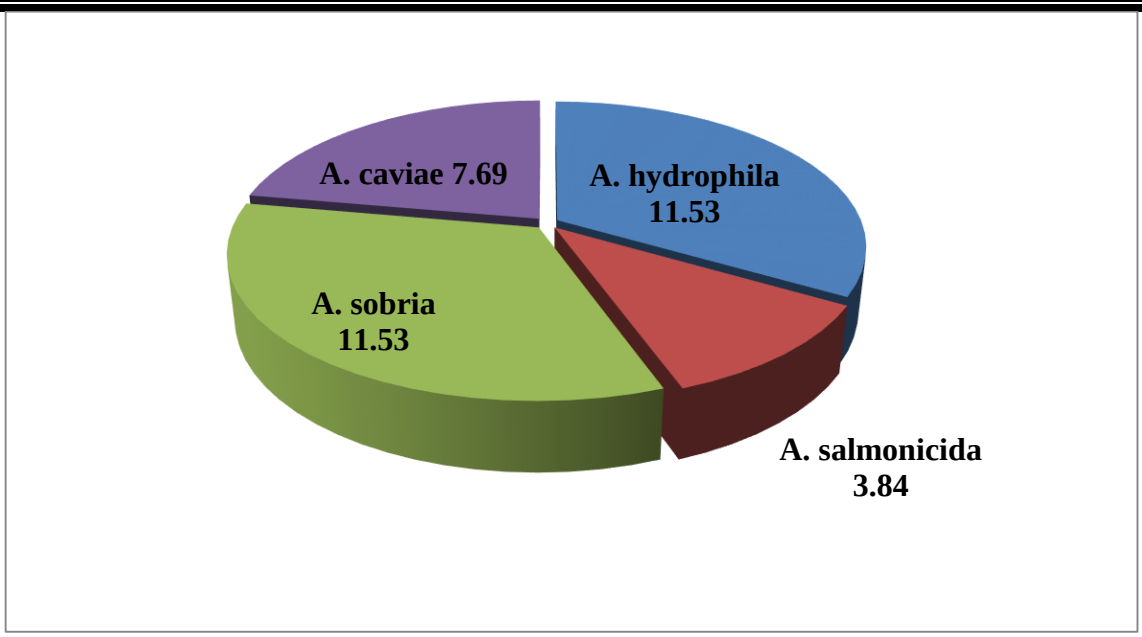
للتأكد من صحة التشخيص الأولي الذي تم التوصل إليه استخدمت العدة التشخيصية API 20 Eوهذا يتفق مع العديد من البحوث الحديثة التي أستخدمت API 20 Eومنها (10و29و30) وكذلك جهاز الفايتك حيث تؤدي إلى كشف أسرع لبكتريا الأيروموناس دون الحاجة إلى استخدام العديـــد مـــن الأوســـاط الزرعيـــة ، وهي أقـــل عرضـــة للتلوث فضلاً عن دقـــة تشخيـص العينات المعزولة بهذه الطرق مقارنة بالطرق الأخرى (31) ، كما أنها تشخص البكتريـــا المعزولـــة بكفـــاءة عاليـــة وعلـــى مستـوى النوع و قد جاءت النتائج مطابقة للتشخيص الأولي من حيث أعداد الأيروموناس ، حيث أظهرت 17 عزلة عائديتها لجنس *Aeromonas* ، حيث شخصت 8 عزلات تعـــود للنوع *A. hydrophila* وعزلـــة واحـــدة تعـــود للنـــوع *A. salmonicida*و 4 عزلات تعود للنوع*A. sobria* بالإضافة إلى 4 عزلات تعود للنوع *A. caviae* ، الجدول (3) 0

الجدول (3) أعداد وأنواع بكتريا الأيروموناس المعزولة حسب مصادرها

العينة		*A. hydrophila*	*A. salmonicida*	*A. sobria*	*A.caviae*
بيئية	شط الديوانية	2	1	2	1
	سواقي	1	-	-	1
	آبار ارتوازية	-	-	1	-
	مياه الحنفية	-	-	-	-
سريرية	خروج	5	-	1	2
	إدرار	-	-	-	-
	جروح	-	-	-	-
	حروق	-	-	-	-
العدد الكلي		8	1	4	4

من خلال متابعة نسب عزل بكتريا الأيروموناس من المصادر بيئية (مياه) { شط الديوانية ، السواقي ، الآبار الارتوازية ، مياه الحنفية}، الشكل (1) ، يُلاحظ ارتفاع نسبة العزل من هذه العينات حيث بلغت 34,6% ، وهذا يشير وبشكل واضح إلى التكيف الناجح لهذه البكتريا للبيئات المائية كذلك فأن المياه وخصوصاً النهرية تعتبر المستقبل الرئيسي للملوثات نتيجة تدفق مياه المجاري وفضلات المناطق الحضرية إلى هذه الأنهار ، أن نسبة العزل في هذه الدراسة هي أعلى من نسب العزل في دراسة [32] الذي حصل على نسبة عزل 18% وهذا قد يعود إلى انخفاض معدلات التلوث في المياه أو ارتفاع نسب معالجة المياه التي عزل منها الباحث ، كما أنها أقل قليلاً من نسبة العزل التي حصل عليها [33] الذي عزلها من المياه العذبة و حصل على نسبة 40,3 % ، بينما لم يتم عزلها من مياه الحنفية وهذا يعود إلى أن استخدام الكلور في عمليات التعقيم يقضي على عدد كبير من الأحياء المجهرية ومنها بكتريا الأيروموناس أو تخفض أعدادها إلى مستوى غير مؤثر فقد ذكرت [34] أن أعداد الأيروموناس في مياه الشرب المعالجة تكون قليلة بحيث لا يمكن الكشف عنها وأن عودة نمو هذه البكتريا يعتمد على المحتوى العضوي لتلك المياه ودرجة الحرارة ووقت تواجدها في شبكات التوزيع وكمية الكلور المتبقي 0وبذلك تكون النسب المئوية لأنواع الأيروموناس المعزولة من مصادر بيئية (مياه) كالتالي :

A. ، % (11,53) : *A. sobria*،% (3,84) : *A. salmonicida* ، % (11,53) : *A. hydrophila* *caviae*: (7,69) % على التواليمن مجموع العينات البيئية البالغ (26) ، من خلال هذه النتائج يلاحظ أن أعلى نسبة عزل لبكتريا الأيروموناس من المياه كانت للنوع *A. hydrophila* و *A. sobria* تليها*A.caviae*في المرتبة الثانية و *A. salmonicida*في المرتبة الثالثة 0



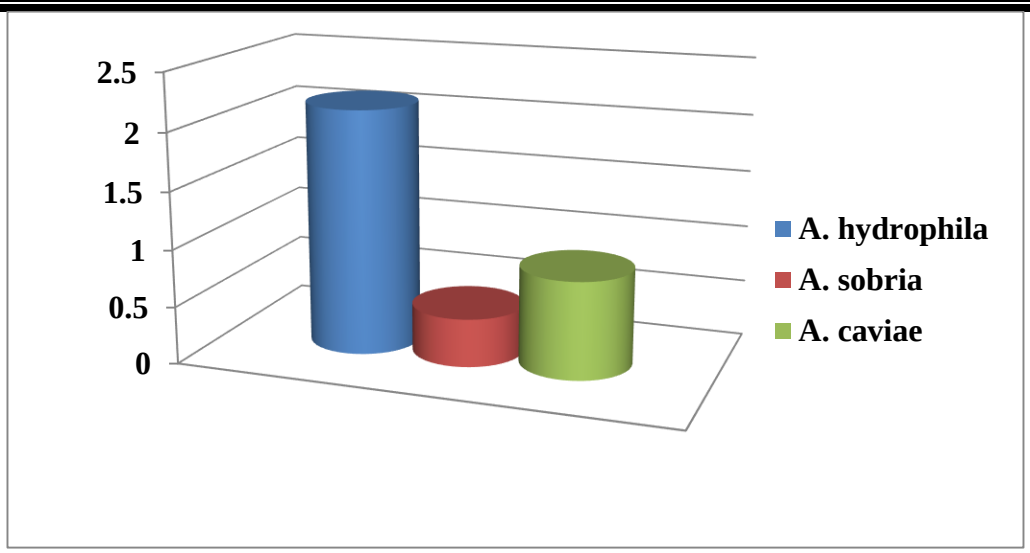
الشكل (1) نسب عزل بكتريا الأيروموناسمنالمصادر البيئية (المياه)

أما بالنسبة للعينات السريرية فقد تم الحصول على 8 عزلات من أصل 233 عينة سريريه مأخوذة من مصادر مختلفة (خروج ، إدرار ، جروح ، حروق) من مرضى راقدين في مستشفى الديوانية للنسائية والأطفال و مستشفى الديوانية العام وكانت نسبة العزل لهذه العينات 3,34 % ، أن نسبة العزل في هذه الدراسة تماثل ما توصل إليه [35] في دراسته التي أجراها في دولة جيبوتي الذي حصل على نسبة عزل 3,3% ، وكذلك [2] الذي حصل على نسبة عزل 3,12% في دراسته التي أجراها في نيجيريا ، كما حصل [28و36] على نتائج مقاربة حيث حصلوا على نسبة عزل 4,5 % و 4,8% على التوالي ، أما دراسة [37] في بريطانيا فقد حصل من خلالها على نسبة عزل 2,5 % وهي أقل قليلاً من نسبة عزل هذه الدراسة 0

لم يتم في هذه الدراسة عزل بكتريا *Aeromonas sp.* من الإدرار وهذا قد يعود إلى أنه في الظروف الطبيعية تكون الكلية و المثانة البولية و الحالب معقمة ، ويكون الإدرار في المثانة البولية معقماً أيضاً بفعل بعض العوامل كانخفاض قيمة pH في الإدرار أو وجود بعض النواتج الأيضية السامة كاليوريا أو بعض الإنزيمات والذي يؤدي إلى قتل بعض أنواع البكتريا ومنها الأيروموناس ، وكذلك لم يتم عزلها من الجروح وهذا يتفق مع [38و39] حيث لم يستطع كلاهما من عزلها من الجروح وهذا قد يعود إلى استخدام التعقيم الذي يقضي على عدد كبير من البكتريا ومنها الأيروموناس أو بسبب قلة أعداد عينات الجروح المجموعة أو الاختلاف في شدة الإصابة ، كذلك لم تستطع هذه الدراسة عزل البكتريا من الحروق حيث أن حالات الالتهاب الناتجة عنها غير شائعة ، وهذا قد يعود أيضاً إلى قلة أعدادالعينات المأخوذة أو الوقت الذي جمعت فيه العينات حيث جمعت معظمها في الشتاء وكذلك التعقيم المستخدم في ردهات الحروق 0

أما النسب المئوية لأنواع الأيروموناس المعزولة من مصادر سريريه فهي كالتالي :

A. hydrophila : (2,14) % ، *A. sobria* : (0,42) % ، *A. caviae* : (0,85) % على التواليمن مجموع العينات السريرية البالغ (233) ، وبذلك تكون أعلى نسبة عزل لبكتريا الأيروموناس من العينات السريرية عائدة للنوع *A. hydrophila* تليها *A. caviae* بينما يأتي النوع *A. sobria* في المرتبة الأخيرة ، الشكل (2) ، نسب عزل بكتريا الأيروموناس من المصادر السريرية 0



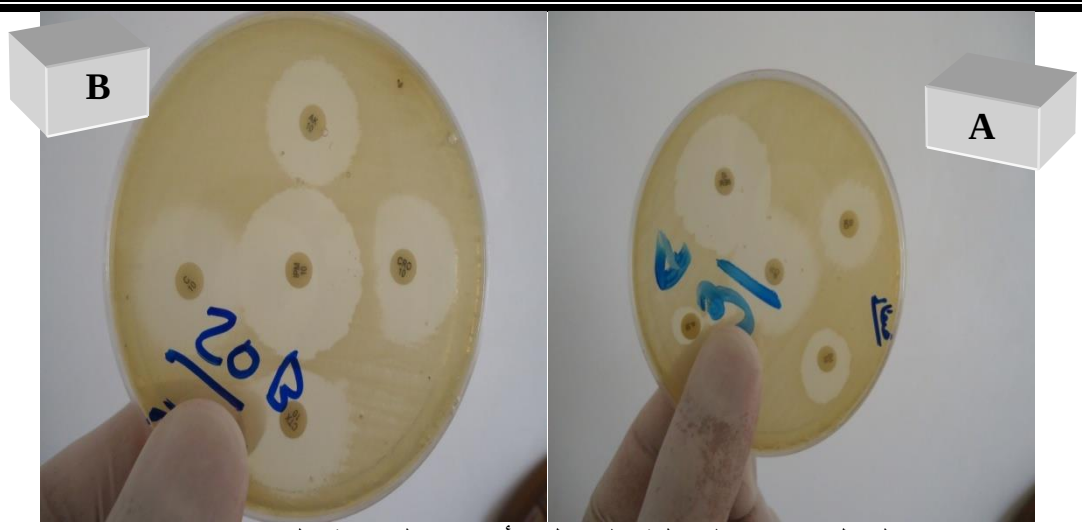
الشكل (2) نسب عزل بكتريا الأيروموناسمنالمصادر السريرية

التحليل الإحصائي Static analysis

استخدم اختبار T (الراوي ، 2000) للتأكد فيما إذا كانت هناك فروق معنوية بين أعداد بكتريا الأيروموناس المعزولة من مصادر بيئية (مياه) عن تلك المعزولة من مصادر سريريه باستخدام بيانات الجدول (3) ، بينت النتائج الإحصائية عدم وجود فروق معنوية بين أعداد بكتريا الأيروموناس المعزولة من تلك المصادر **0**

استجابة بكتريا الأيروموناس للمضادات الحيوية :

درست استجابة بكتريا *Aeromonas sp.* للمضادات الحيوية على وسط مولر هنتون وباستخدام 10 مضادات حيوية اعتماداً على قياس قطر منطقة التثبيط ، الشكل (3) ، بالمسطرة (بالمليمتر) ، قورنت النتائج التي تم التوصل إليها مع أقطار التثبيط القياسية المحددة من قبل [40] ، أظهرت النتائج بأن هناك تبايناً في استجابة العزلات قيد الدراسة تجاه المضادات المستخدمة ، إذ أظهرت معظم البكتريا مقاومة عالية لكل من مضاد PenicillinG و Clindamycin إذ بلغت76,47 % و 82,35 % من العزلات مقاومة للمضادين أعلاه على التوالي ، فيما أظهرت العزلات نسب حساسية مختلفة لمضادات Gentamicin و Cefotaxime و Ceftriaxone (88,23% و 70,58% و 76,47%) على التوالي ، كما أظهرت جميع العزلات حساسية عالية لمضادات Imipenem و Meropenem و Ciprofloxacin و Amikacin و بنسبة 100% لكل مضاد ، أما ما يخص مضاد Chloramphenicol فقد أظهرت 17,64% من العزلات مقاومة لهذا المضاد 0



الشكل (3) مناطق التثبيط حول الأقراص المشبعة بالمضاد باستخدام :

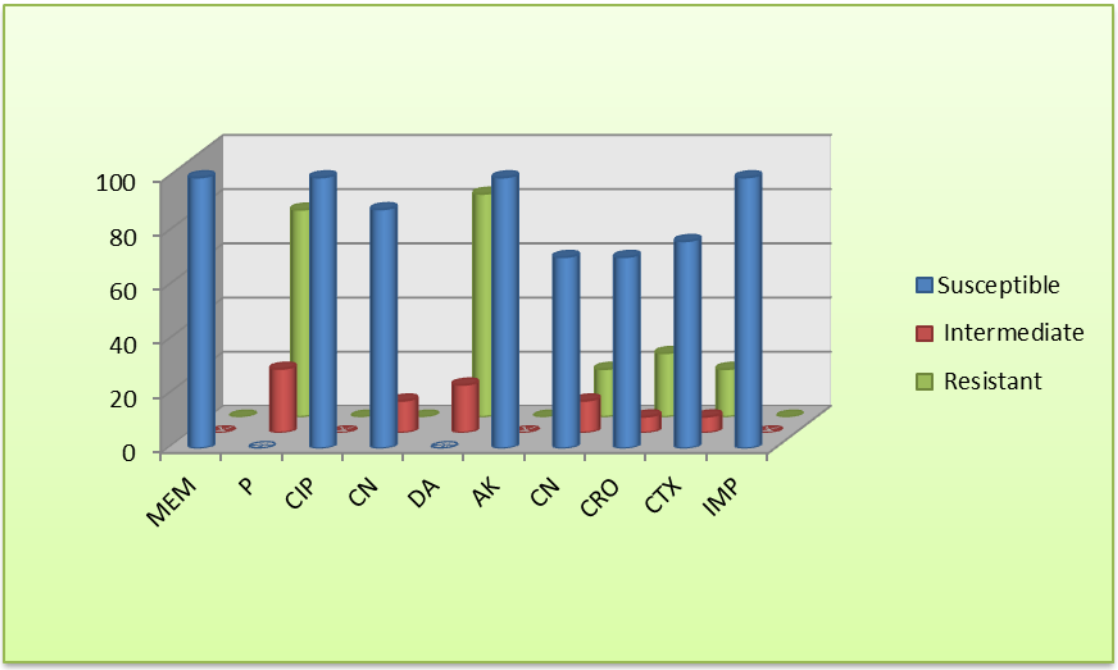
A - PenicillinG، Ciprofloxacin، Clindamycin ، Gentamicin ، Meropenim

B – Amikacin، Chloramphenicol، Imipenem ، Cefotaxime ، Ceftriaxone

من خلال ملاحظة النتائج التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة نجد أن هناك مقاومة عالية لمجموعة ألبيتا لاكتام Beta-lactam وكذلك مضاد Clindamycin من مجموعة Lincosamides ، حيث أظهرت 76,47 % و 82.35 % مقاومة للمضـــادين PenicillinG و Clindamycin على التوالي والمستخدمين في هذه الدراسة وهي أقل من النسبة التي توصل إليها [41] حيث كانت نسبة مقاومة عزلاته لمضادPenicillinG 100 % ، كما حصل [42] على نسبة مقاومة 100 % لمضاد Clindamycin ، أن ارتفاع نسب المقاومة تجاه هذا النوع من المضادات قد يعود إلى قدرة البكتريا على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز والتي يشفر لها عن طريق مورثات محمولة على الكروموسومات أو البلازميدات ، كما أشار [43] إلى أن مقاومة البكتريا لهذه المضادات يعود إلى قلـــة ألفـــة البروتينات الرابطة للبنسلينات (PBPs) أو قلـــة نفـــاذ المضـــاد إلـــى داخـــل الخليـــة البكتيرية والتي تؤدي إلى صعوبة العلاج بهذا النوع من المضـــادات 0 فيما يخص مضادات إلـ Carbapenemsالمتمثلة بـ (Imipenem , Meropenem) فقد أشارت النتائج إلى حساسية مطلقة لجميع العزلات وبنسبة 100% تجاهها وهذا يعود إلى فعاليـــة وقابلية هذه المضادات على اختراق الأغشية البكتيرية الخارجية بالإضافة إلى ثباتها العالي تجاه معظم إنزيمات البيتالاكتاميز ، وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل إليه [42و44] 0 أما بالنسبة لمضاد Ciprofloxacin من مجموعة Quinolones فقد أشارت النتائـــج إلـــى حساسيـــة جميـــع العزلات وبنسبـــة 100% لهذا المضاد وبنسبة مقاومة 0,0% وهذه النتيجة تماثل ما توصل إليه [42و44] ، أن الفعالية التثبيطية العالية لهذا المضاد قد تعود إلى قلة استخدام هذا المضاد للأغراض العلاجية مما يفسر عدم أو ضعف مقاومة البكتريا لهذا المضاد 0 من بين المضادات الحيوية من مجموعة Aminoglycosides لوحظ أن مضاد Amikacin كان أكثر فعالية من ألـ Gentamicin فقد كانت جميع العزلات وبنسبة 100% حساسة تجاه Amikacin ، بينما كانت 88,23 % حساسة للـ Gentamicin وهذه النتيجة تتفق تقريبـــاً مـــع مـــا توصـــل إليـــه [44] الذي حصـــل علـــى نسبـة حساسية (100% و 99%) على التوالي تجاه مضاد Amikacin و Gentamicin ، أن ظهور و ازدياد مقاومة البكتريا في السنوات الأخيرة لمجموعة الأمينوكلايكوسايد قد يعود إلى قدرة البكتريا على إنتاج مجموعة جديدة و محورة من الإنزيمات المضادة للأمينوكلايكوسايد Aminoglycoside Modifying Enzymes مثل Phosotransferases , Nucleotidyltransferases , Acetyl transferases التـــي تعمل على تقليل ارتباط هذه المضادات بالرايبوسوم وبالتالي فشل عمل المضاد في تثبيـــط عمليـــة تصنيـــع البروتيـــن فـــي الخليـــة البكتيريـــة أو عن طريق تقليل نفاذية الخلية ومنع دخول جزيئات المضاد إلى داخلها وبالتالـــي ظهور المقاومة تجاه هذه المضادات0 اما بالنسبة لمضادات الجيل الثالث من مجموعـــــة Cephalosporins كالـCefotaxime، Ceftriaxone فقد بينت النتائج

حساسية 70,58 % و 76,47% على التوالي لمضـادي Ceftriaxone و Cefotaxime ، في حين كانت نسبـة المقاومـة لهما 23,52 % و 17,64% على التوالي ، أن ظهور المقاومة لمضادات الجيل الثالث من السيفالوسبورينات من قبل هذه البكتريا يعتبر مؤشراً خطراً لقدرة هذه البكتريا على تطوير وسائل دفاعية تجاه المضادات الحيوية المستخدمة ضدها وهذا قد يؤدي إلى فشل هذه المضادات في معالجة الأمراض الناتجة عن هذه البكتريا ، كما أن استعمـال العديـد من المضادات في آن واحد قد يؤدي إلى أن يثبط بعضها عمل البعض الآخر وهذه الحالة قد تحدث عند عدم تشخيص المسبب المرضي بشكل دقيق فيلجأ البعض إلى استعمال تشكيلة من عدة مضادات في آن واحد وهذا يتفق مع ما ذكره[45] بأن استعمال المضادات بشكل واسع يزيد قدرة بكتريا *Aeromonas sp.* على إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز والتي تمنح البكتريا القدرة على مقاومة الأجيال الجديدة من السيفالوسبورينات 0 أما فيما يخص مضاد إلـ Chloramphenicol من مجموعة إلـ phenicols فقد أظهرت العزلات مقاومة منخفضة تجاهه حيث قاومت 17,64% فقط من العزلات هذا المضـاد وهـذه النسبـة أعلى مما توصلت إليه [47] والتي حصلت علـى نسبـة مقاومـة 8% ، في حين كانت نسبة مقاومة عزلات [42] 0و0 % ، أن هذا الأختلاف في نسب المقاومة قد يعود إلى اختلاف أعداد العزلات المجموعة من قبل كل باحث أو اختلاف الأنواع التابعة لجنس الأيروموناس بالإضافة إلى الاختلاف بين أماكن جمع العزلات لكل باحث ، أن مقاومة البكتريا للمضاد الحيوي Chloramphenicol نادرة وهي تتكون نتيجة الاستخدام العشوائي للأدوية ويتم التشفير لها عن طريق البلازميدات أو العناصر القافزة ، إلا أنه على الرغم من ذلك فأن مضاد إلـ Chloramphenicol يعتبر من العلاجات الناجحـة بسبـب قدرتـه العالية على تثبيـط عملية تصنيع البروتين في الخلية البكتيرية 0

نتيجة لهذه الدراسة فأن مضادات Imipenem و Meropenem و Amikacin و Ciprofloxacin هي من أهم الخيارات العلاجية في علاج الإصابات التي تسببها بكتريا *Aeromonas sp.* إذ كانت نسبة المقاومة لهذه المضادات من قبل هذه البكتريا 00و0 % مما يجعلها من العلاجات الناجحة ضدها 0كما أن هذه الدراسة هي الأولى في عزل بكتريا الأيروموناس من المياه ومن حالات الأسهال في مدينة الديوانية ، الشكل (4) ، النسب المئوية لحساسية الأيروموناس تجاه المضادات المستخدمة في هذه الدراسة 0



الشكل(4) النسب المئوية لحساسية الأيروموناس تجاه المضادات المستخدمة في هذه الدراسة

References

1- Ventura, C., civera, T., and Grassi, M.A., 1998. *Aeromonas* aliments; rishi sanitariemodalita di controllo. Indian Alim 37,982.

2- Rogo L. D., Attah A., Bawa E. and Aishatu A. M. (2009). Antimicrobial Susceptibility Pattern of *Aeromonashydrophila* among Patient presented with diarrhea attending Abouth Zaria and Akth Kano , Nigeria . World J. of Biologic. Res., 1: 1-7 .

3- AnavellaGaitan Herrera (2004).Aeromonads in Environmental Waters. Environ. Microbiol., Methods in Biotechnology , 16 :97-102 .

4- Ghenghesh, K., El-Ghodban, A., Dkakni, R., Abeid, S., Altomi, A., Tarhuni, A. andMarialigeti, K. (2001). Prevalence, species differentiation, hemolytic activity, and antibiotic susceptibility of Aeromonads in untreated well water. Mem. Inst. OswaldoCruz 96, 169–173.

5-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 edition, Volume 2, Springer-Verlag, New York, NY.

6- Chauret, C., Volk, C., Creason, R., Jarosh, J., Robinson, J. andWarnes, C. (2001) Detection of *Aeromonashydrophila* in drinking-water distribution system: a field and pilot study. Can. J. Microbiol. 47, 782–786.

7- Farmer II, J.J., Arduino, M.J., and Hickman- Brenner, F.W., (2005). The Geneva *Aeromonas* and *Plesiomonas*, The prokaryotes 1991-2006 Springer Verlag New York.

8- Korbsrisate,S.; Dumnin,S.; Chawengkirttikul,R.; Gherunpong ,V.; Eampokalap B.; Gongviseisoog,C.; Janyapoon,K.; Lertpocasombat K. and Shimada,T. (2002).Distribution of *Aeromonashydrophila*serogroups in different clinical samples and the development of polyclonal antibodies for rapid identification of the genus *Aeromonas* by direct agglutination. Microbiol. andImmunol. 46, 875-879.

9- Horneman AJ, Ali A and Abbott S. (2006). Aeromonas. In: Manual of Clinical Microbiology, Ninth Edition, Murray P (Ed), ASM Press.

10-J. M. Janda and S. L. Abbott (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection, Clin. Microbiol. Rev., vol. 23, no. 1, pp. 35–73.

11- J. H. Isonhood and M. Drake (2002). *Aeromonas* species in foods, J. Food Protect., vol. 65, no. 3, pp. 575–582 .

12- A. M. Carnahan and S. W. Joseph (2005)." Aeromonadaceae," in The Proteobacteria, Part B, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, D. J. Brenner, J.T.Krieg, andG.M. Garrity, Eds., Springer, New York, NY, USA.

13- K. S. Ghenghesh, S. F. Ahmed, R. A. El-Khalek, A. Al-Gendy, and J. Klena (2008). *Aeromonas* infections in developing countries ,J. Infect. in Develop. Countries, vol. 2, no. 2, pp. 81–98 .

14- Gosling PJ. (1996).*Aeromonas* species in diseases of animals. In: The Genus: *Aeromonas*, First Edition, Austin B, Altwegg M, Gosling PJ, Joseph SW (Eds), John Wiley and Sons, Ltd, Chicester. p.175.

15- WHO (2002). Scaling up the response to infectious diseases, World,Health Organization report on Infectious diseases. Geneva، Switzerland .

16- S. W. Joseph and A. M. Carnahan(2000).Update on the genus *Aeromonas* , ASM News, vol. 66, no. 4, pp. 218–223.

17- L. Bravo, L. Morier, N. Castaneda et al.,(2003). *Aeromonas*: an emerging pathogen associated with extra-intestinal infection in Cuba, RevistaCubana de Medicina Tropical, vol. 55, no. 3, pp. 208–209.

18- J. Vila, F. Marco, L. Soler, M. Chacon, and M. J. Figueras(2002)"In vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonascaviae, Aeromonashydrophila*and*Aeromonasveronii biotype sobria*," . J. Antimicrob . Agents Chemother, vol. 49, no. 4, pp. 701–702.

19- Fosse, T., C. Giraud-Morin, I. Madinier, F. Mantoux, J. P. Lacour, and J. P. Ortonne (2004).*Aeromonashydrophila* with plasmid-borne class A extended-spectrum Beta lactamase TEM- and three chromosomal class B,C, and D Beta-lactamases, isolated from a patient with necrotizing fasciitis. J. Antimicrob . Agents Chemother. 48:2342-2344.

20- Sanchez-Cespedes, J., M. D. Blasco, S. Marti, E. Alcalde, C. Esteve, and J. Vila (2008). Plasmid-mediated QnrS2 determinant from a clinical *Aeromonasveronii* isolate. . J. Antimicrob . Agents Chemother. 52:2990-2991.

21- Barlow, R., and K. Gobius (2009). Environmental reservoirs of integrons: the contribution of production environments to the presence of integrons in beef cattle. Annual meeting of the Australian Society for Microbiology - Perth WA. [Poster].

22- Clinical Institute and Laboratory Standards (2011). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing:21st informational supplement. CLSI M100-S21.

23- National Committee for Clinical Laboratrry Standards (NCCLS) (2002).Preformance standards for antimicrobial susceptibility testing: twelfth informational supplement (m100-s12). National Committee for clinical laboratory Standerd. Wayne.

24- Khalaf, Subhi H., Thikra S. Ali andSahi J. Dhahi (2005). The Use of Modified Rimler-Shotts Agar as a Selective Medium for the Isolation of *Aeromonas* Species from Children Diarrhea in Mosul-Iraq. Raf. Jour. Sci., Vol.16, No.7 Biology, Special Issue, pp.5-14.

25- Abbott**,** S. L.; Cheung , W. K., and Janda, J. M. (2003).The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypicidentification schemes. J. Clin .Microbiol. 41,2348-23 .

26- Vivas J. , Saa A. I.,Tinajas A.,Barbeyto L. and Rodriguez L. A.(2000). Identification of Motil*Aeromonas* Strains with the MicroScan Walkaway System in Conjunction with the Combo Negative Type 1S Panels. App. andEnviro. Microbiol. , Vol.66 ,NO. 4 ,P. 1764-1766 .

27- Kay B.A., Guerrero, C.E.and Sack, R.B. (1985). Media for isolation of *Aeromonashydrophila* .J.Clin.Microbiol.22 (5):888-890.

28 - الخالدي ، رشا عبد علي و سامرة يونس يوسف (2011)0 عزل وتشخيص الانواع المتحركة من بكتريا *Aeromonas spp.* المعزولة من مصادر مختلفة 0 مجلة مركز بحوث التقنيات الاحيائية (عدد خاص) ، المجلد الخامس ، العددالثالث ، ص 56-65 0

29-KhalifaSifawGhenghesh , Salwa F. Ahmed , Rania Abdel El-Khalek , Atef Al-Gendyand John Klena(2008). Aeromonas-Associated Infections in Developing Countries. J Infect Developing Countries. 2(2):81-98.

30- Chi-Jung Wu,Yin-Ching Chuang, Mei-Feng Lee, Chin-Chi Lee, Hsin-Chun Lee et al., (2011) . Bacteremia Due to Extended-Spectrum-B-Lactamase-Producing Aeromonas spp. at a Medical Center in Southern Taiwan. J. Antimicrob. Chemother. (55) 12: 5813–5818.

31- Mohamed Nawaz , Kidon Sung , Saeed A. Khan , Ashraf A. Khan and Roger Steele (2006). Biochemical and Molecular Characterization of Tetracycline-Resistant *Aeromonasveronii* Isolates from Catfish. App. and Environ. Microbiol. , Vol. 72, No. 10, p. 6461–6466.

32- Ghenghesh K.S., Belhaj K., Algaui A., Alturki E., Rahouma A. andAbeid S. (2007) . Bacteriological quality of drinking water obtained from mosques in Tripoli , Libya. Libyan J. Infect. Dis. 1:49-53.

33- M. L. Hanninen& A. siitonen (1995). Distribution of *Aeromonas*phenospecies and genospecies among strains isolated from water, foods or from human clinical samples. Epidemiol. Infect. ,115, 39-50 .

34- WHO (2001). Guidelines for drinking water quality. Addendum : Microbiological agents in drinking water .World Health Organization ,Genva.

35- Mikhail I.A, Fox E., Haberberger R.L., Ahmed M.H. andAbbatte E.A.(1990). Epidemiology of bacterial pathogens associated with infections diarrhoea in Djibouti. J. Clin. Microbiol. , 28:956-61.

36 - حمود ، ماجد نوري (1998) 0 عزل وتشخيص أنواع جرثومة *Aeromonas* من حالات الإسهال في مدينة البصرة ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة البصرة 0

37- Wilcox M.H., Cook A.M., Eley A. and Spencer R.C.(1992).*Aeromonas spp.* as a potential cause of diarrhea in children. J. Clin. Pathol. , 45:959-963.

38 - الطائي ، محمد ابراهيم نادر (2005) 0 دراسة كيموحيوية ومناعية لأنزيم البروتييز المنتج من العزلة المحلية *Aeromonashydrophila* 0اطروحة دكتوراه 0كلية العلوم 0جامعة بغداد 0

39 - ابراهيـــم ، رواء خليل (2002)0دراسة بعض عوامل الضراوة لبكتريا *Aeromonashydrophila* المعزولة من حالات مرضية 0رسالة ماجستير0كلية العلوم 0جامعة بغداد0

40-CLSI , Clinical and Laboratory Standards Institute (2005).Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Proposed Guideline. M45-P, Vol. 25, No. 26.

41- GE Mu-xiang, Zhang Yan-ying, Fang Hai, Wang Xiu-yun, Jin Xiao-min and Chen Cui-Zhen (2012). Examination of red-leg disease and its pathogen, Ranatemporariachensinensis. Afr. J. Microbiol. Res. Vol. 6(4), pp. 819-825.

42- Krishnan Sreedharan,Rosamma Philip and Isaac Sarojani (2012).Virulence Potential and Motile Aeromonads associated with fresh water ornamental fish culture system : A Possible threat to public Health. Brazilian J. of Microbiol. p: 754-765.

43- Jacoby, G. A. and Munoz-Price, L. S. (2005). The new beta-lactamases. N Engl. J. Med., 352(4): 380-91.

44- Max A. , Timothy J. , Barbara H. , Thomas V. and Barbara J.(2011). Antimicrobial susceptibility of *Aeromonas spp*. isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents. J. Antimicrob . Agents Chemother, 56, p. 1110–1112.

45- Fosse T.; Morin C.; Madinier I.; Mantoux F. ,Lacour J. P. andOrtonne, J.P. (2004) . *Aeromonashydrophila* with plasmid-borne class A extended –spectrum beta lactamase TEM-24 and three chromosomal class B,C and D beta-lactamases, isolated from a patient with necrotizing fasciitis . J.Antimicrob . Agents Chemother . 48(6):2342-3.

46- Obi C.L. , Ramalivhana J. , Samie A. and Igumbor E.O.(2007). Prevalence, Pathogenesis, Antibiotic Susceptibility Profiles, and In-vitro Activity of Selected Medicinal Plants Against *Aeromonas* Isolates from Stool Samplesof Patients in the Venda Region of South Africa. J. Health Populnutr , 4: 428-435.

47- Senderovich Y, Ken-Dror S, Vainblat I, Blau D, Izhaki I, et al.(2012) A Molecular Study on the Prevalence and Virulence Potential of *Aeromonas spp.* Recovered from Patients Suffering from Diarrhea in Israel. PLoS ONE 7(2): 1- 13 .

Isolation and identification of *Aeromonas spp*. from Clinical and Environmental sources and study It's Sensitive for Antibiotic

Safaa M. Salman Azhar N. Hussien
AL-Qadisiya University / Collegeof Education / Biology Department
Az.almousawi@yahoo.com

Abstract :

Total of 259 samples fromvariant clinical source for patients of AL-Diwanyia's hospitals and environmental source (water) were collected from the date 10/11/2012 – 10/3/2013 ,Biochemical and morphological characterization tests besides use of API 20 Eand Vitek System showed that seventeen isolates wereidentified as Aeromonas spp.These Isolates characterized as : 8 Isolates belong to *Aeromonashydrophila* , 4 Isolates belong to *Aeromonassobria* , 4 Isolates belong to*Aeromonascaviae* and one isolate belong to*Aeromonassalmonicida* .Antibiotic susceptibility tests of all the isolates towards ten antibiotics agents were carried out and results showed that 76.47 % were resistant to PenicillinG , 82.35 % resistant to Clindamycin ana 100 % sensitive for Imipenem,Meropenem , Ciprofloxacinand Amikacin , 17.64 % showed resistant to Chloramphenicol . The Isolates showed different sensitive for Gentamicin و Cefotaxime و Ceftriaxone (88.23 % , 70.58 % , 76.47 %) .