دور المحتوى البلازميدي في تعدد المقاومة للمضادات الحياتية في جرثومة *Aeromonas hydrophila* المعزولة من حالات الإسهال في الأطفال

قيس قاسم غنيمة *

تاريخ قبول النشر 2006/5/2

المستخلص

جمعت 100 عينة من خروج أطفال مصابين بالإسهال وتم التحري عن جرثومة *Aeromonas hydrophila* وعزلت الجرثومة من 7 عينات فقط (7%).

العزلات المحلية لهذه الجرثومة كانت مقاومة لمضادات الامبسلين، الكاربنسيلين، الكلورامفينيكول، التتراسايكلين، اللنكوسين وحامض النالدكسك.

تم إجراء تحييد المحتوى البلازميدي للعزلات المحلية باستخدام صبغة الاكردين البرتقالية. إن تجربة التحييد أظهرت فقدان العزلات المحلية لمقاومة المضادات الحياتية: الامبسيلين، الكاربنسيلين، الكلورامفينيكول، التتراسايكلين وهذه النتيجة دلت على إن مقاومة هذه المضادات الحياتية كان مرتبطاً بالمحتوى البلازميدي.

المقدمة

تعد جرثومة *Aeromonas hydrophila* مسبباً مهماً من مسببات الأمراض المعوية Gastroenteritis [1] وان أكثر إصابات الجرثومة للجهاز المعدي المعوي تتواجد في الأطفال والمسنين والموهنين مناعياً حيث يتدرج الالتهاب المعوي الذي تسببه الجرثومة من درجة متوسطة (إسهال مائي) إلى درجة أكثر حدة (إسهال دموي) [2, 3].

إن النوع *Aeromonas hydrophila* يعد أكثر مقاومة للمضادات الحياتية من بقية أنواع الجنس *Aeromonas*، وان معظم العزلات السريرية لهذا النوع أظهرت مقاومة للبنسيلينات واختلافاً في حساسيتها للسيفالوسبورينات [4]، وقد أشارت العديد من الدراسات إلى إن هذه البكتريا تعد متعددة المقاومة Multiple-drug resistance مما يزيد من خطورتها وأحداث مشاكل عند العلاج [5].

لوحظ وجود بلازميدات في معظم السلالات المعزولة من عينات سريرية، ويتراوح الوزن الجزيئي لهذه البلازميدات Mega (4.6-5.1 dalton) وان مقاومة المضادات قد تكون محمولة على هذه البلازميدات [6].

لقد استهدفت هذه الدراسة الحصول على عزلات لجرثومة *Aeromonas hydrophila* من عينات الإسهال من الأطفال وتشخيصها ودراسة مقاومتها لمجموعة مختارة من مضادات الحياة، ودراسة العلاقة بين هذه المقاومة ووجود البلازميد في هذه الجرثومة.

المواد وطرائق العمل

العينات والعزل

جمعت 100 عينة من عينات الإسهال في الأطفال (دون عمر 7 سنوات) من مستشفى الطفل المركزي خلال المدة من شهر كانون الثاني إلى شهر آذار للعام 2004 في أوعية بلاستيكية معقمة وزرعت باستخدام ناقل زرع معقم على أوساط اغار الدم واغار ماكونكي واغار TCBS (Thiosulphate Citrate Bile Agar) وحضنت عند درجة حرارة 37 م ولمدة 24 ساعة، وشخصت بالاعتماد على الصفات التشخيصية المقترحة من قبل مصنف بركي 1984 [7] وللتأكد من صحة التشخيص تم استخدام نظام التشخيص (API-20E).

* قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة بغداد

أختبار الحساسية للمضادات الحياتية

استخدمت طريقة الانتشار على سطح الاغار الصلب باستخدام الأقراص Disc-Diffusion method [8] لاختبار حساسية جرثومة Aeromonas hydrophila للمضادات الحياتية. حيث لقح وسط Mueller-Hinton agar، باستخدام مسحة قطنية من لقاح عدد الخلايا الجرثومية فيه 1.5×10^8 خلية/مل، ووضعت أقراص المضادات الحياتية وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م لمدة 24-48 ساعة. وكانت أقراص المضادات المستخدمة المجهزة من شركة (Oxoid) وتراكيزها بالـــ (µg/ml) كالآتي:

Ampicillin (10), Carbenicillin (50), Cephotaxime (30), Cepha- lothin (30), Gentamycin (10), Kanamycin (25), Rifampin (30), Tr-imethoprin-sulfamethoxazole (25), Nalidixic acid (30), Chlora-mphenicol (30), Tetracyclin (30), Colistin (10), Lincocin (10) and Ciprofloxacin (10).

تحييد البلازميديات باستخدام صبغة الاكردين البرتقالية

اتبعت طريقة Trevors 1986 [9] في معاملة عزلات جرثومة *Aeromonas hydrophila* بوساطة صبغة الاكردين البرتقالية (حيث تم اختيار تركيز الصبغة التي سبقت التركيز المثبط الأدنى لاختبار التحييد والمتمثل بالتركيز [100 µg/ml] والتي يكون فيها عدد الخلايا الحي اقرب إلى السيطرة غير المعاملة).

ويحضر هذا التركيز في 5 مل من المرق المغذي ويترك أنبوب من دون إضافة الصبغة كسيطرة وتلقح الأنابيب بحوالي 10^4 خلية/مل وتحضن بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة، ثم تعمل تخافيف لجميع المزارع المعاملة والسيطرة غير المعاملة حيث يخفف المزروع إلى 10^{-5}، 10^{-6}، 10^{-7} وينشر مقدار 0.2 مل على وسط الاغار المغذي الصلب ويحضن بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة أو حتى ظهور مستعمرات بشكل واضح، بعدها تم نقل 100 مستعمرة بوساطة أعواد خشبية وبطريقة (Pick and Patch) إلى إطباق من الاغار المغذي الحاوي على المضادات الحيوية قيد الدراسة والتي قاومتها الجرثومة وحضنت الإطباق عند درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة وتم ملاحظة النتائج، ولغرض التعرف على الخلايا المحيدة فإننا نلاحظ عدم ظهور نمو على وسط المضاد وظهوره على الوسط الخالي من المضاد وهذا يعني أن الخلية فقدت صفة مقاومة ذلك المضاد.

النتائج والمناقشة

من مجموع 100 عينة إسهال من الأطفال تم الحصول على 7 عزلات محلية شخصت على إنها تعود للنوع *Aeromonas hydrophila* أي بنسبة عزل 7%، اعتماداً على الاختبارات التشخيصية المعتمدة من قبل مصنف بركي 1984 [7] وكما مبين في الجدول (1) وتم التأكد من صحة التشخيص باستخدام نظام التشخيص (API 20 E).

جدول (1): نتائج الاختبارات التشخيصية لجرثومة *Aeromonas hydrophila*

ت	الاختبار	النتيجة
.1	استجابة الخلايا لصبغة كرام	G -ve
.2	شكل الخلايا	Rod
.3	النمو على وسط اغار الدم	+
.4	النمو على وسط اغار ماكونكي	+
.5	النمو على وسط TCBS (Thiosulphate Citrate Bile Agar)	+
.6	النمو على وسط اغار TSI (Triple Sugar Iron Agar)	A*/A - +
.7	تحليل كريات الدم الحمر	β
.8	النمو على اغار O/F (Oxidation-Fermentation Agar)	+
.9	اختبار MR-VP (Methyl Red-Vogous Proskauer broth)	++
.10	تخمير سكر اللاكتوز	+
.11	اختبار استهلاك السترات	+
.12	الحركة	+
.13	القدرة على النمو اللاهوائي	+
.14	الحساسية للعامل المضاد لجرثومة الهيضة O/129	R**
.15	اختبار تحلل الاسكلين	+
.16	اختبار أنزيم الكاتاليز	+
.17	اختبار أنزيم الاوكسديز	+
.18	اختبار أنزيم اليوريز	−

*A/ حامض، -/ H_2S production

+/ Gas production

**R/ مقاومة.

إن نسبة عزل هذه الجرثومة من عينات الإسهال في هذه الدراسة هي أعلى مما سجل في ليبيا 2.3% [10]، واقل مما سجل في استراليا حيث

عزلت بنسبة 10.4% [11]، وأشارت العديد من البحوث إلى أن مدى عزل هذه الجرثومة من الإسهال يتراوح بين (0.81-12.7)% [1] وقد يعود اختلاف النسب المئوية للعزل إلى اختلاف وقت جمع العينات والموقع الجغرافي.

يتضح من الجدول (2) إن هنالك اختلافاً بسيطاً في مقاومة العزلات المحلية للمضادات الحياتية لكنها جميعها مقاومة للمضادات الحياتية: امبسيلين، كاربنسيلين، كلورامفينيكول، تتراسايكلين، لنكوسين وحامض نالدكسك.

جدول رقم (2): حساسية العزلات المحلية لجرثومة *Aeromonas hydrophila* للمضادات الحياتية*

المضاد الحيوي	الرمز	التركيز	حساسية العزلات الجرثومية للمضادات الحياتية / رقم العزلات الجرثومية 1	2	3	4	5	6	7	النسبة المئوية للمقاومة
Ampicillin	Amp.	10	R	R	R	R	R	R	R	100%
(Pyopen) Carbenicilin	Py	50	R	R	R	R	R	R	R	100%
Cephalothin	CF.	30	R	R	R	S	R	S	S	57.1%
Cephotaxime	CE.	30	S	S	S	S	S	R	S	14.3%
Gentamycin	G.	10	S	S	S	S	S	S	S	–
Kanamycin	K.	25	S	S	S	S	S	S	S	–
Rifampin	R.A.	30	R	S	S	S	S	S	S	14.3%
Chloramphnicol	Ch.	30	R	R	R	R	R	R	R	100%
Tetracyclin	TE.	30	R	R	R	R	R	R	R	100%
Colistin	CL.	10	S	S	S	S	R	R	R	42.8%
Trimethoprim-Sulfamethoxozole	SXT.	25	S	R	S	S	S	R	S	28.5%
Lincocin	L.	10	R	R	R	R	R	S	S	71.4%
Nalidixic acid	N.A.	30	R	R	R	R	R	R	R	100%
Ciprofloxacin	CIP.	10	S	S	S	S	S	S	S	–

R*: تم مقارنة النتائج مع أقطار مناطق التثبيط المعتمدة لتحديد حساسية أو مقاومة العزلات الجرثومية والمثبتة في نشريات (12) (NCCLS, 1999).

R**: مقاومة للمضاد الحيوي

S***: حساسة للمضاد الحيوي.

إن مقاومة العزلات المحلية لجرثومة Aeromonas hydrophila لمضادات الـ β- lactam (Ampicillin and Carbenicillin) قد يعود إلى إنتاج إنزيمات الـ β- lactamase [4]، وقد أشارت العديد من الدراسات إلى مقاومة هذه البكتريا لمضادات الكلورامفنيكول، التتراسايكلين، اللنكوسين وحامض النالدكسك [10, 13] وتتفق نتائج هذه الدراسة مع ما ذكر بعض الباحثين من إن مجموعة الكلايكوسيدات الامينية مثل الكانامايسين والجنتامايسين وكذلك مجموعة الـ Quniolone مثل السبروفلوكساسين تظهر فعالية ضد جرثومة [14] *Aeromonas hydrophila*.

تم إجراء عملية التحييد على جميع العزلات المحلية لجرثومة *Aeromonas hydrophila* واختبار حساسية الجراثيم المحيدة تجاه المضادات التي أظهرت لها مقاومة عالية وكما في الجدول (3)، حيث تم الحصول على عزلات محيدة عند التركيز 100 µg/ml من صبغة الأكردين البرتقالية.

جدول (3) فقدان المقاومة للمضادات الحياتية في سلالات بكتريا *Aeromonas hydrophila* بعد التحييد باستخدام صبغة الاكردين البرتقالية

المضاد الحيوي	الرمز	التركيز µg/ml	النسبة المئوية لتحييد البلازميدات المسؤولة عن مقاومة المضادات الحياتية باستخدام صبغة الاكردين البرتقالية / رقم العزلة الجرثومية 1	2	3	4	5	6	7
Ampicillin	Amp.	10	S	S	95	S	77	95	80
(Pypen) Carbenicillin	Py	50	S	80	S	85	92	S	S
Chloramphnicol	Ch.	30	90	79	S	S	S	S	95
Tetracyclin	TE.	30	S	S	88	S	91	S	97
Lincocin	L.	30	R	R	R	R	R	S	S
Nalidixic acid	N.A.	30	R	R	30	R	R	10	R

يتضح من الجدول (3) إن استخدام صبغة الاكردين البرتقالية أدى إلى حدوث تحييد في مقاومة العزلات الجرثومية للمضادات الحيوية امبسيلين، كاربنسيلين، كلورامفينيكول، تتراسايكلين نتيجة إيقاف تضاعف البلازميدات R factors الحاملة لصفة مقاومة المضادات الحياتية بوساطة هذه الصبغة [15].

إن حدوث التحييد في مقاومة المضادات الحيوية امبسيلين، كاربنسيلين يعود إلى إن صفة مقاومة هذه المضادات محمولة على البلازميدات R عن طريق وجود المورثات المسؤولة عن إنتاج انزيمات الـ β- lactamase على هذه البلازميدات والتي تحطم مضادات البنسيلينات

والسيفالوسبوربنات [16]، وتتفق النتائج التي حصلنا عليها مع العديد من الباحثين من إن معظم عزلات *Aeromonas hydrophila* تكون مقاومة لمضاد التتراسايكلين وان هذه الصفة محمولة على بلازميدات [17, 18]، أما بالنسبة للمضاد كلورامفينيكول فان حدوث التحييد لهذا المضاد ربما يعود إلى فقدان صفة إنتاج أنزيم Acetyl-transferase chloramphenicol الذي يثبط عمل هذا المضاد والمحمولة على البلازميدات [16].

ويلاحظ من الجدول (3) أيضا عدم حدوث تحييد لمقاومة المضادات الحياتية اللنكوسين وحامض النالدكسك حيث إن عدم حدوث تحييد لمقاومة اللنوكسين يعود إلى أن مقاومة هذا المضاد يحدث نتيجة طفرات كروموسومية تؤدي إلى فقدان موقع الارتباط المناسب على وحدات 505 على الرايبوسوم [16]، وقد يعزى سبب عدم حدوث تحييد لمقاومة حامض النالدكسك إلى أن الصفة المسؤولة عن مقاومة هذا المضاد واقعة على نوع آخر من البلازميدات غير النوع R factor.

REFERENCE

1. Altkin, J. T. and Clearly, T. G., 2000, chapter. 202-*Aeromonas* and *Plesiomonas*. Filei// B:/ Behromonas. htm., (Internet).
2. Janda, J. M., 1991, Recent advances in the study of the taxonomy, Pathogenicity and infections syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 397-410.
3. Juan, H. J. Tang, R. B., Wa, T. c. and Yu, K. W., 2000 , Isolation of *Aeromomas hydrophila* in children with diarrhea. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 33: 115-117.
4. Chandburg, A., Nath, G., Shakla, B. N. and Sanyal, Sc., 1996, Biochemical, characterization, enteropathogenicity and antimicrobial resistance of clinical and environmental *Aeromonas* isolates. *J. Med. Microbiol.* 44: 434-437.
5. Holmberg, S. D. and Farmer, J. J., 1984, *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomona.s shigelloides* as causes of Intestinal infections. *Rev. Infect. Dis.* 6: 633-639.
6. Vandivelu, J. Puthucheary, S. D., Philipps, M. and Chee, Y. W. 1995, Possible virulence factors involved inbacteraemia caused by *Aeromonas hydrophila*. *J. Med. Microbiol.* 42: 171-174.
7. Propoff, M., 1984, Genus III *Aeromonas* kluyven and Van Niel 1936, PP. 545-548. In: N. R. krieg and J. G. Holt (ed). Bergey's manual of systematic Bacteriology, Vol. 1. The William and Wilkins co., Baltimore.
8. Hindler, J., 1998, Antimicrobial Susceptibility testing. In: Essential procedures for clinical microbiology. Isenberg H.D., AsM press, Washington. D.C. pp. 128-140.
9. Trevors, J. T. 1986, Plasmid curing in bacteria. *FEMS microbiology reviews.* 32: 149-157.
10. Ghenghesh , K. S. , Bura, f., Bukris, B. and Abid, S.S., 1999, characterization of virulence factors of *Aeromonas* isolated from children with and with outdiarrhea in Tripoli, Lipya. *J. diarrhoeal Dis. Rev.* 17: 75-80.

11. Burke, V., Gracey, M., and Robinson, J., 1983, The microbiology of childhood gastroenteritis. *Aeromonas* species and other infective agents. *J. Infect. Dis.* 148: 68-74.

12. National Committee for Clinical Laboratory Standards 1999, performance standards for Antimicrobial Susceptibility testing. 9th informational supplement ed. Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

13. Janda, J. M. and Abbott, S. L., 1998, Evolving conceets regarding the genus *Aeromonas*, *Clin. Infect.* Dis. 27: 332-344.

14. Miranda, C. D. and Gastillo, G., 1998, Resistance to antibiotics and heavy metals of motile Aeromonads from Chilean freshwater Science of the total Environment, 224: 167 - 176.

15. King, R. C., 1977. Handbook of Genetics: Bacteria, Bacteriophages and fungi. Vol. 1. Plenum press, London pp. 121-130.

16. Jawetz, M., Brooks, G. F., Batel, J. S. and Morse, S. A. 1998, medical microbiology 21th. ed. Appelton and Lange , Clalifornia.

17. Toranzo, A. E. Burja, J. L. Coiwell , R. R. and Hetrick F. M. *1983,* characterization of plasmids in bacterial fish pathogen. *J. Infect. Immun.* 39 (1): 184-192.

18. Borreg, J. J., morinigo, M. A., Martinez — manzanres, F., Bosca, M., Castro, Barja, J. L. and Toranzo, A. E. 2004, properties of environmental isolates of *Aeromonas-hydrophila.* http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ query.fcyi, (Internet).

The Role of Plasmid Content in Multiple Drug Resistance in *Aeromonas hydrophila* Isolated From Diarrhoeal Samples of Children

Kais K. Ghanima *

* College of science/ University of Baghdad

ABSTRACT

100 diarrhoeal samples were collected from children and speculated for *Aeromonas hydrophila.* This bacterium isolated from 7 samples only (7%). The local isolates were resist to antibiotics: Ampicillin, Carbenicillin, Chloramphenicol, Tetracyclin, Lincocin and Nalidixic acid.

Curing the local isolates of their plasmid was performed by using acridine orange. Curing experiment indicated that the local isolates lost their resistance to Ampicillin, Carbenicillin, Chloromphenicol and Tetrac yclin and this result revealed that the resistance of these antibiotics was associated with plasmid content.