مقاومة بكتريا *Aeromonas hydrophila* المعزولة من براز الأطفال المصابين بالتهاب الأمعاء للمضادات الحيوية

الدكتورة :ندى محفوض

قسم علم الحياة – كلية العلوم – جامعة حمص – سوريا

الملخص

جرى في إطار هذا البحث عزل البكتريا التابعة للجنس *Aeromonas* من(277) عينة براز أطفال مصابين بالتهاب الأمعاء، درست بعض الخصائص المزرعية والمجهرية والبيوكيميائي إذ شخصت(14)عزلة تعود لبكتريا*Aeromonas hydrophila* من مجموع (97)عينة إيجابية الزرع البكتيري مشكلة بذلك نسبة 14.4%. أظهرت نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية أن جميع عزلات *Aeromonas hydrophila* قيد الدراسة أبدت مقاومة متعددة (MDR) multi drug resistance لأغلب المضادات الحيوية المستخدمة، فبلغت نسبة العزلات المقاومة للمضادات الحيوية ,Amoxicillin ,Ampicillin, Bacitracin, Cefuroxime, Cloxacillin , Cephalexin, Penicillin G, Erythromycin, Flumequine, Tetracyclineو نسبة 100%، في حين أبدت حساسية تامة بنسبة 100%لكل من Chlorotetracyclin و Azithromycin، فيما تباينت نسب المقاومة للمضادات الحيوية Amikacin, Ciprofloxacin, Gentamycin و Streptomycinإذ بلغت35.71%،21.43%،50%و14.29%على

التوالي، وللكشف عن وجود مورثتين من مورثات المقاومة لبعض المضادات الحيوية فيDNA بكتريا *Aeromonas hydrophila* هما المورثتين blaAmpc و blaOxA المسؤولتان عن انتاج انزيم β– lactamase بينت نتائج الرحلان الكهربائي بهلام الأغاروز بتركيز 2% لنواتج تفاعل PCR أن ثلاث عزلات من*Aeromonas hydrophila* هي:Ah1 وAh2 وAh7 تمتلك القطع المضخمة من المورثة blaAmpc بنسبة 42.86% وبعد المقارنة مع الحزم العائدة إلى الواسم الجزيئي المعياري DNA ladder بلغ الوزن الجزيئي للحزم الناتجة 550زوج قاعدي، وأن ثلاث عزلات هي Ah5 وAh6 وAh7 تمتلك القطع المضخمة من مورثة blaOxA مشكلة نسبة42.86%، بلغ الوزن الجزيئي للحزم الناتجة564زوج قاعدي بعد المقارنة مع الحزم العائدة إلى الواسم الجزيئي المعياريDNA ladder، وأن العزلة Ah7 قد امتلكت كلتا المورثتين blaAmpc وblaOxA وقد قاومت (14) مضاد حيوي مشكلة أعلى نسبة مئوية للعزلات المتعددة المقاومة للمضادات في هذه الدراسة والبالغة 87.5% ، وأظهرت مقاومة شديدة لمضادات مجموعة البيتالاكتام المستخدمة في الدراسة إذ تراوحت قيم MIC لها بين (512–>1024)مكغ/مل، وعلى الرغم من عدم امتلاك بقية العزلات الى هاتين المورثتين إلاّ أنهم أبدوا مقاومة مرتفعة لعدد من المضادات الحيوية مما يشير إلى امتلاكهم آليات مقاومة أُخرى للمضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية : التهاب الأمعاء،*Aeromonas hydrophila* ،مقاومة متعددة للمضادات الحيوية.

Abstract

Within the framework of this study, bacteria belonging to the genus *Aeromonas* were isolated from 277 stool samples collected from children suffering from gastroenteritis. Several cultural, microscopic, and biochemical characteristics were studied. 14 samples out of a total 97 bacterially positive samples, representing 14.4% were identified as *Aeromonas hydrophila* .The results of the antibiotic susceptibility test showed that all *Aeromonas hydrophila* isolates under study exhibited multidrug resistance (MDR) to most of the antibiotics used. The resistance rate reached 100% against Amoxicillin, Ampicillin, Bacitracin, Cefuroxime, Cloxacillin, Cephalexin, Penicillin G, Erythromycin, Flumequine, and Tetracycline. In contrast, the isolates showed 100% sensitivity to Chlorotetracyclin and Azithromycin. However, the resistance rates varied for Amikacin, Ciprofloxacin, Gentamycin, and Streptomycin, reaching 35.71%, 21.43%, 50%, and 14.29%, respectively. To detect the presence of two antibiotic resistance genes in the DNA of *Aeromonas hydrophila*, namely blaAmpc and blaOxa, which are responsible for the production of the β-lactamase enzyme, agarose gel electrophoresis (2%) of PCR products revealed that three isolates (Ah1, Ah2, and Ah7) possessed the amplified fragments of the blaAmpc gene with a

percentage of 42.86%. Comparison with the standard molecular marker (DNA ladder) showed that the molecular size of the amplified fragments was 550 bp. The results also showed that three isolates (Ah5, Ah6, and Ah7) possessed the amplified fragments of the blaOxa gene with a percentage of 42.86%, and the molecular size of the amplified fragments was 564 bp compared with the DNA ladder. Furthermore, the results indicated that isolate Ah7 possessed both genes (blaAmpc and blaOxa). This isolate showed resistance to 14 antibiotics, representing the highest percentage of multidrug-resistant isolates in this study (87.5%).The isolate also exhibited strong resistance to β-lactam antibiotics used in the study, with MIC values ranging from(512-1024 <)µg/ml. Although the remaining isolates did not possess these two genes, they still showed high resistance to several antibiotics, suggesting the presence of other antibiotic resistance mechanisms.

Keywords:

Gastroenteritis, *Aeromonas hydrophila*, Multidrug resistance.

المقدمة Introduction

عُزلت بكتريا *Aeromonas hydrophila* لأول مرة منذ أكثر من 80 عاماً، لكن الدلائل على أنها من ضمن الأنواع الإنتهازية والممرضة للإنسان فقد كان في بداية عام 1980، وعلى الرغم من المعلومات العديدة التي جمعت حول عوامل إمراضيتها إلا أن ميكانيكية تسببها للإسهال غير مفهومة كلياً [1]

فعوامل إمراضيتها تشمل إنتاجها لعدّة ذيفانات مثل Hemolysin،Aerolysin،Enterotoxin و Cytolysinوعدد من الإنزيمات مثل acetyl transferase،phospholipaseو proteaseنتيجةً لذلك يمكن ان تسبب *Aeromonas hydrophila* العديد من الأمراض عند الإنسان كالتهاب السبيل الهضمي والتهاب النسيج الخلوي والتهاب البلعوم واللوزتين والتهاب الرئة وفي حالات نادرة ممكن أن تسبب التهاب السحايا والتهاب الشغاف القلبي [2]، كما أنها تسبب تجرثم الدم وإنتانه خاصةً عند المرضى المصابين بسرطان الدم [3].

إن انتشار *Aeromonas hydrophila* على نطاق واسع في العالم و في المنظومات المائية المتعددة والمختلفة تشير إلى تلوث الماء بالبكتريا وما تسببه هذه البكتريا من خسائر اقتصادية من خلال إمراضيتها لمدى واسع من الكائنات المائية ،وإن وجودها في براز الإنسان يعكس ببساطة انتقالها من المياه إلى الأغذية كاللحوم و المنتجات البحرية والحليب والمنتجات الغذائية [4]، وقد عزلت من عدة عينات سريرية من الإنسان مثل البراز، القشع، الحنجرة، المرارة، البول، الدم و الخراجات [5].

بيّنت دراسة Gavriel و آخرون عام 1998مسؤولية *Aeromonas hydrophila*عن إحداث نوعين من الإلتهابات المعوية عند الإنسان النوع الأكثر شيوعاً يكون مشابها إلى الإصابة بالكوليرا من حيث الصفات البراز السائل والحمى المعتدلة في الأطفال في عمردون 12سنة ويصاحبها عادة تقيؤاً [6]،أما النوع الثاني يكون مشابهاً إلى الديزنتري من حيث تواجد الدم والمادة المخاطية في البرازوهو الأكثر شدةً وقد تستمر إلى عدة أسابيع،وهناك الكثير من الأدلة على وبائية *Aeromonas hydrophila*حيث عُزلت بصورة متكررة من عينات براز مرضى مصابين بالإسهال وفي كثير من الحالات هناك علاقة واضحة بين عزل *Aeromonas hydrophila* من عينات البراز ووجود حالة الإسهال وتكون *Aeromonas hydrophila*هي أحد العوامل الممرضة المشتبه بها في حالات الإسهال بعد المعالجة بالمضادات الحيوية وخاصةً عند الأطفال [7].

أكدت دراسة Kotloff عام (2016) امتلاك بكتريا *Aeromonas hydrophila* جينوم معقّد يحوي العديد من المورثات التي تمنحها القدرة على تحمل الظروف البيئية القاسية كما أنها قادرة على النمو بدرجات حرارة تتراوح بين4 إلى 42□م بالإضافة لمنحها مقاومة تجاه العديد من المضادات الحيوية وهذا ما يشار له بالمقاومة الذاتية بالإضافة إلى ظهور سلالات ذات مقاومة ذاتية بالإضافة لاكتسابها المقاومة المكتسبة التي تكون بسبب ظهور سلالات مقاومة من الأنواع البكتيرية الحساسة سابقا بعد تعرضها لمضادات معينة سببها الجينات القافزة (Transposone) إذ تم تشخيص عدد من الجينات القافزة المسؤولة عن المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية مثل1459− ApP ،ErM3 ،Tn971 و Tn961 نجم عنها حدوث طفرات تلقائية جعلتها مقاومة للعلاج بالمضادات الحيوية، [8] أو بلاسميدات المقاومة Resist plasmids أو مورثات صبغية المنشأ أو بلاسميدية مثل blaTEM،blaSHV، blaAMPC و blaOXA المسؤولين عن إنتاج انزيم β− lactamase [9] ومورثات مسؤولة عن مضخات الدفق Efflux pumps

(Es)أو نتيجة طفرات صبغية ينجم عنها تغير في نفاذية الغشاء الخارجي الذي يحتوي على فتحات بوروينية (porins)من نوع OprD وإن حدوث أي تغيير في مواقع هذه الفتحات يؤدي إلى حدوث مقاومة لعدد من المضادات الحيوية[10].

أهمية البحث

نظراً للأهمية الطبية التشخيصية و العلاجية، ولندرة البحوث المحلية عن إمراضية *Aeromonas hydrophila*ومقاومتها المتعددة لأغلب المضادات الحيوية التي أصبحت مصدر قلق للأطباء بسبب الانتشار السريع والخيارات العلاجية المحدودة والنتائج الضارة للمرضى وخصوصاً الأطفال فهي مشكلة يصعب علاجها، من هنا جاءت الأهمية كونها تهدد الصحة العامة، وإن معرفة نسب المقاومة للمضادات الحيوية يساعد في محاولة الحد من انتشارها.

أهداف البحث

- عزل بكتريا *Aeromonas hydrophila* من براز الأطفال المصابين بالتهاب الأمعاء .
- تشخيص العزلات اعتماداً على الصفات المزرعية وصبغة غرام والاختبارات الكيموحيوية.
- اختبار حساسية بكتريا*Aeromonas hydrophila* للمضادات الحيوية .
- قياس التراكيز المثبطة الدنيا لبعض مضادات مجموعة β- lactam .
- الكشف *عن وجود* مورثتين من مورثات المقاومة في بكتريا *Aeromonas hydrophila* وهما المورثتين *blaOxA* وblaAmpc المسؤولتان عن انتاج انزيم β- lactamase .

المواد و طرائق البحثMaterials and Methods

-استخدمت الأوساط الزرعية الآتية لعزل وتشخيص *Aeromonas hydrophila* :

Cary Blair transport media،MacConkey agar ،Blood agar، Nutrient broth ، Mueller Hinton broth و Mueller Hinton agar (حضرت حسب تعليمات الشركات المصنعة وعُقمت بالأوتوكلاف بدرجة حرارة121□م وضغط 15بار/انج^2 لمدة 15دقيقة) .

–صبغة غرام ،أوساط وكواشف الاختبارات الكيموحيوية،عدة تشخيص البكتريا السالبة لصبغة غرام(API–20 E)Analytic Profile Index، أقراص ومساحيق مضادات حيوية مختلفة،عدة استخلاص(Genomic DNA)(Presto ™Mini G.DNA Bacteria Kit)،مواد تفاعل البلمرة المتسلسل المتضمن كيت PCR^{R}AccuPower PreMix .

مكان العمل :

أُجريت تجارب البحث في مخبر البحث العلمي في قسم علم الحياة في كلية العلوم في جامعة حمص ومخبر التقانات الحيوية في كلية الهندسة الحيوية في جامعة حلب .

جمع العينات :

تم جمع277عينة براز لأطفال مراجعين لمشافي وعيادات ومراكز صحية ومخابر تحليلات مرضية في مدينة حمص من كلا الجنسين وبأعمار تراوحت بين(6 أشهر – 9سنوات) مصابين بالتهاب الأمعاء خلال المدة ما بين (شهر تموز عام2024 – شهر آب عام 2025).

العزل و التشخيص:

زُرعت العينات في الوسط الناقلCary Blair transport mediaوحُضنت بظروف هوائية بدرجة 37 م□ لمدة 24ساعة ليتم عزل البكتريا وتنقيتها ثم تشخيصها اعتماداً على مصنف(Bergyes manual) عام (1994) [11]،

وذلك من خلال دراسة الفحص المجهري والصفات الزرعية للمستعمرات النامية على أوساط مختلفة واجراء الاختبارات الكيموحيوية وفقاً لطريقة العمل المذكورة في[12]التي شملت الاختبارات الآتية:

الكاتالاز، الأوكسيداز، الاندول، أحمرالمثيل، الفوكس بروسكاور ،استهلاك السترات، القابلية على انتاج اليورياز، وللتأكد من صحة التشخيص على مستوى النوع *Aeromonas hydrophila* استُخدام نظام(API) الذي يحتوي على 20اختبار، طُبقت اعتماداً على تعليمات الشركة المصنعة وفسرت النتائج بالاعتماد على النشرة المرفقة.

اختبار حساسية بكتريا *Aeromonas hydrophila* للمضادات الحيوية :

حسست عزلات بكتريا *Aeromonas hydrophila* لأقراص المضادات الحيوية المذكورة في الجدول(1)، إذ اتُبعت طريقة الانتشار بالآغار، تم إجراء الاختبار اعتماداً على طريقة Kirby– Bauer وفقاً لما ذكره Quinn وآخرون في عام(2004) [12]، ومحفوض عام(2016) [13]، وذلك بتنمية مستعمرة بكتيرية نقية بعمر 24 ساعة من كل عزلة في مرق Mueller broth Hinton، وحضنت بدرجة 37م□لمدة5 ساعات وقورنت عكارتها مع محلول ثابت العكارة القياسي0.5 Mcfarland وقيست الامتصاصية عند طول موجة625 نانومتر إذ قدرت قيمة الامتصاصية 0.1 والتي تقدر عدد الخلايا البكتيرية 1.5×10^8 خلية/مل، ونشر 100 مايكرولتر من المعلق البكتيري على سطح أغارMueller Hinton agar وتركت لمدة 10 دقائق لحين التشرب، وضعت أقراص المضادات الحيوية على سطح الوسط وحضنت الأطباق بدرجة 37 م□لمدة24 ساعة ثم قيست أقطار هالات تثبيط النمو البكتيري المحيطة بكل قرص من أقراص المضادات الحيوية باستخدام ورق مليمتري مدرج، وقورنت مع الجدول المرفق بالمضادات الحيوية.

جدول(1) المضادات الحيوية المستخدمة في البحث

اسم المجموعة التي ينتمي إليها المضاد الحيوي	تركيزه	رمزه	اسم المضاد
Aminoglycoside	30	AK	Amikacin
Penicillins	30	Am	Amoxycillin
Penicillins	10	A	Ampicillin
Polypeptide	10u	B	Bacitracin
Cephalosporines	30	CF	Cefuroxime
Tetracyclines	30	Cl	Chlorotetracyclin
Penicillins	10	CX	Cloxacillin
Cephalosporines	30	CP	Cephalexin
FluroQuinolones	5	Cf	Ciprofloxacin
Macrolides	30	Az	Azithromycin
Aminoglycoside	10	G	Gentamycin
Penicillins	2U	P	PenicillinG
Macrolides	15	E	Erythromycin
Quinolones	25	F	Flumequien
Tetracyclines	30	T	Tetracycline
Aminoglycoside	50	S	Streptomycin

قياس التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibitory Concentration(MIC)

استُخدمت طريقة التراكيز المضاعفة المتسلسلة في الأنابيب وتم تحديد القيم باستخدام مرق Mueller Hinton مع تمديدات من المضادات الحيوية المستخدمة، إذ تم اتباع طريقة Quinnوآخرون في عام(2004)[12]وفقاً لما جاء في [14] و[15] وذلك بتحضير محاليل خزينة (stock solution) من المضادات الحيوية المستخدمة بتركيز نهائي مقداره 10 ملغ/مل وعقمت باستخدام مرشحات دقيقة الثقوب(millipore filter 0.22 µm) وأُضيف كل مضاد بتراكيز متسلسلة متضاعفة تراوحت ما بين(0.125–1024) مكغ/مل إلى كل أُنبوب من أنابيب الاختبار الحاوية على5 مل من (Mueller Hinton broth) المعقمة، مزجت جيداً ثم لقحت بـ100 مايكرولتر من كل عزلة على حدة يقدر عدد الخلايا البكتيرية بها 1.5×10^8 خلية/مل، وحضنت الأنابيب بدرجة 37 م□لمدة24 ساعة، استخدم وسط زرعي خالٍ من أي مضاد حيوي كشاهد إيجابي، تم اختبار أول أُنبوب رائق يأتي بعد سلسلة أنابيب عكرة ليكون تركيز المضاد بهذا الأُنبوب هو التركيز المثبط الأدنى.

استخلاص Genomic DNA وقياس تركيزه و نقاوته :

استُعمل كيت لاستخلاص الـ DNA الجينومي من بكتريا *Aeromonas hydrophila* وتمت عملية الاستخلاص حسب تعليمات الشركة (Presto ™MiniBacteria G.DNA Kit) وذلك بتنمية عزلات بكتيريا*Aeromonas hydrophila* –التي أبدت أعلى مقاومة للمضادات الحيوية المستخدمة والتي شملت العزلات (Ah1)،(Ah2)، (Ah3)، (Ah4)، (Ah5)، (Ah6) و (Ah7) (– في مرق Nutrient broth وحُضنت بدرجة 37م□لمدة18 ساعة، ثم رُسبت الخلايا بجهاز الطرد المركزي بسرعة (6000) xg لمدة 2 دقيقة، وعُلقت بـ 200مايكرولتر من محلول S1 ومُزجت بلطف وتُركت بدرجة حرارة الغرفة مدة 5 دقائق، ثم أُضيف 200مايكرولتر من محلول S2ومُزجت بلطف وتُركت في حمام مائي بدرجة حرارة 70 م□لمدة10دقائق، ثم أُضيف إلى

المعلق 5 مايكرولتر من إنزيم RNase، ثم مُزجت جيداً وحضن المزيج بدرجة 37 م□ لمدة ساعة، ثم أُضيف إلى المعلق400 مايكرولتر من الواقي NB buffer ومُزج بلطف عدة مرات، ثم أُجري طرد مركزي بسرعة (16000) xg لمدة 10 دقائق، نُقل الطافي إلى عمود التنقية المحمول على أُنبوب ابندروف معقم وطُرد مركزياً بسرعة (10000) xg لمدة 1 دقيقة، ثم غُسل العمود بإضافة 700 مايكرولتر من wash buffer، وطُرد مركزياً بسرعة(10000)xg لمدة 1 دقيقة، وتم التخلص من الطافي وإضافة100 مايكرولتر من Elution buffer، وحُضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة 1 دقيقة، ثم وطُرد مركزياً بسرعة(10000) xg لمدة 1 دقيقة للحصول على DNA، كما تم قياس تركيز ونقاوة الـDNA المستخلص من العزلات (Ah1)،(Ah2)، (Ah3)، (Ah4)، (Ah5)، (Ah6) و(Ah7) باستخدام جهاز Spectrophotometer –Nanodrop من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي 260نانومتر و280 نانومتر، إذ تم إتباع طريقة Maniatis وآخرون عام (1982) [16]، ووفقاً لما ذكره Sarkar و Thomas عام(2024) [10].

الرحلان الكهربائي بهلام الأغاروز Agarose Gel Electrophoresis

حُضر هلام الأغاروز بتركيز 2 % للكشف عن نواتجPCR للDNAالمستخلص من العزلات (Ah1)،(Ah2)، (Ah3)، (Ah4)، (Ah5)، (Ah6) و(Ah7) العائدة إلى بكتريا *Aeromonas hydrophila* إذ تم إتباع طريقة Maniatis وآخرون في عام (1982) [16].

الكشف عن المورثات المسؤولة عن إنتاج إنزيم β– lactamase في بكتريا *Aeromonas hydrophila* المقاومة للمضادات الحيوية:

استُخدم جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) للكشف عن وجود المورثتين blaAmpcو blaOxA لدى العزلات (Ah1)،(Ah2)، (Ah3)، (Ah4)، (Ah5)، (Ah6)،

و(Ah7) لبكتريا *Aeromonas hydrophila* واستُعملت المرئسات P1 و p2 للكشف عن المورثتين blaAmpc و blaOxa على التوالي كما موضحة بالجدول (2).

جدول(2) المرئسات المستعملة في تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل في الدراسة

المورثة	رمز المرئسة	تتابع المرئسة 3→5	الوزن الجزيئي للقطعة المضخمة(bp)	المرجع
blaAmpc	P1	– ATGATGAAAAAATGCTTATGC–3 (F)5 5–TTGCAGCTTTTCAAGAAT– (R) 3	550	[9]
blaOxA	p2	5– ATGAAAAACACAATACATATCAACTTCGC– (F) 3 5–GTGTGTTTAGAATGGTGATCGCATT –3 (R)	564	[9]

وحُضر خليط تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لكل مورثة على حدى كما موضح بالجدول (3).

جدول(3) المواد المستعملة في تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل في الدراسة

المادة	التركيز النهائي(µM/ µl)	الحجم (µl)
10x buffer	1 x	2.5µl
$MgSO_4$(50Mm)	3mM	1.5 µl
dNTPs1		1µl
TaqDNA Polymerase(5U)		0.2 µl
Primers(10µM)	10µM	2µl
tamplate DNA	100 ng/ µl	5 µl
dH_20		12.8µl
Total volume		25 µl

تم برمجة جهاز (PCR)حسب ما ذكر في البرنامج الحراري المصمم لهذه الدراسة وبظروف مثلى للكشف عن المورثتينblaAmpc وblaOxA لدى العزلات (Ah1)،(Ah2) ، (Ah3)،(Ah4)، (Ah5)، (Ah6) و(Ah7) لبكتريا *Aeromonas hydrophila* وفق عدة مراحل : مرحلة المسخ الأولي بدرجة حرارة95م□لمدة 5 دقائق، ومرحلة مسخ DNA القالب بدرجة حرارة95 م□ لمدة 30 ثانية، ومرحلة الارتباط بدرجة حرارة55م□لمدة 30 ثانية، ومرحلة الاستطالة بدرجة حرارة72 م□لمدة 45 ثانية، ومرحلة الاستطالة النهائية بدرجة حرارة72 م□ لمدة 5دقائق، بعد ذلك نقل 5مايكرولتر من ناتج تضاعف كل مورثة للرحلان الكهربائي على

هلام الأغاروز المحضر بتركيز2 % وبفرق جهد70 فولط ولمدة 60 دقيقة باتباع طريقة Maniatis وآخرون في عام (1982) [16] .

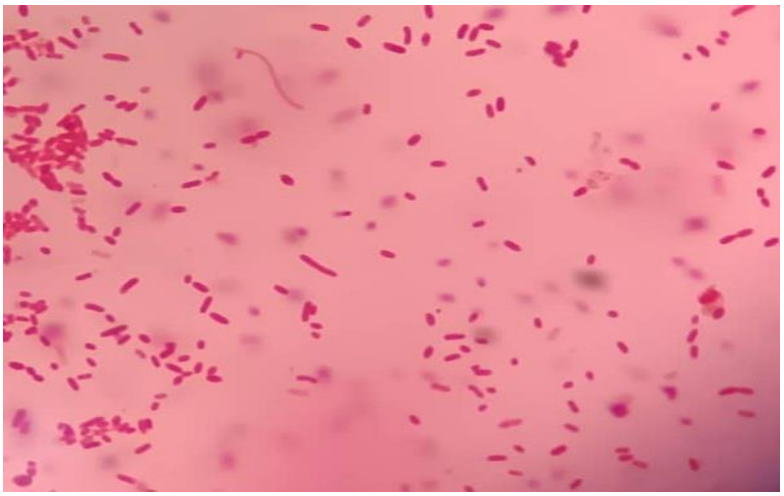
النتائج و المناقشةResults and Discassion

أظهرت نتائج الزرع البكتيري لـ (277) عينة إسهال لأطفال مشخصة إصابتهم بالتهاب الأمعاء من كلا الجنسين تراوحت أعمارهم بين (6 أشهر – 9سنوات) أن(97)عينة فقط قد أعطت زرع بكتيري موجب مشكلة نسبة 35.02% ، يعود سبب ذلك إلى أن كثير من حالات الإسهال عند الأطفال تكون فيروسية المنشأ مثل Rotavirusو Norovirus أو تكون بسبب بكتريا لاهوائية مجبرة أو إصابة طفيلية أو كون الإسهال ناجم عن سبب دوائي أو غذائي، تقاربت نسبة الزرع البكتيري الموجب لعينات براز الأطفال المصابين بالإسهال نتائج دراسة Heydari وآخرون في عام(2024) [17].

تم تشخيص 14عزلة تعود لبكتريا *Aeromonas hydrophila* – رموزها (Ah1، Ah2، Ah3، Ah4، Ah5، Ah6، Ah7، Ah8، Ah9، Ah10، Ah11 ، Ah12، Ah13 وAh14) – من مجموع العينات التي أعطت زرع بكتيري موجب البالغ عددها (97)عينة مشكلة بذلك نسبة % 14.4، وقد قاربت تلك النسبة دراسة الباحث Sadeghi وآخرون في عام(2023) إذ بلغت 13.6% والذي بين أن *Aeromonas hydrophila* أحد المسببات المرضية المسؤولة عن حالات التهابات معدية معوية عند الأطفال تتراوح من الإسهال الخفيف إلى أمراض شديدة تشبه الكوليرا عند الأطفال و البالغين [18]، إلاّ أنها خالفت النسبة التي وجدها الباحث Echeverria

و آخرون في عام(1986)والتي بلغت في دراستهم 10.5% [19]، قد يعود السبب لاختلاف الموقع الجغرافي وعدد العينات المدروسة.

اعتُمدت كل من نتائج الفحص المجهري للبكتريا بعد صبغها بصبغة غرام ونتائج الصفات المزرعية على أوساط زرعية مختلفة ونتائج الاختبارات الكيموحيوية في تحديد هوية *Aeromonas hydrophila*، فتميزت بكونها عصيات قصيرة سالبة لصبغة غرام تترتب بشكل منفرد أو أزواج أو سلاسل قصيرة، شكل (1) .



شكل (1) خلايا تتبع للجنس Aeromonas بعد صبغها بصبغة غرام (100x)

نمت المستعمرات بشكل جيد على وسط MacConkey agar وكانت مستعمراتها شاحبة اللون كونها غير مخمرة لسكر اللاكتوز وبحجم صغير دائري الشكل وبحواف منتظمة، ونمت على وسط

Blood agar محللة خلايا الدم الحمراء بشكل كامل لإنتاجها الإنزيم الحال للدم من نوع β− Hemolysin، أما فيما يخص الاختبارات الكيموحيوية فقد أعطت جميع العزلات قيد الدراسة نتائج موجبة لكل من اختبار الكاتالاز(الذي فسر قدرة البكتريا على تحطيم بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء وغازالأوكسجين)، واختبارالأوكسيداز(الذي بين امتلاك بكتريا *Aeromonas hydrophila* لانزيم Cytochrom oxidase)،واختبار الاندول، واختبارأحمرالمثيل، واختبارالفوكس بروسكاور ، واختباراستهلاك السترات، ونتائج سالبة لاختبار اليورياز، تم الاختيار بشكل عشوائي للعزلة Ah7 لتأكيد التشخيص باستخدام نظامAnalytic Profile Index (API 20E)الخاص بتشخيص البكتريا السالبة لصبغة غرام التي وضحت نتائجه بالجدول (4)، والشكل (2).

جدول (4) نتائج الاختبارات الكيموحيوية لنظام (API 20E) لتأكيد هوية العزلة Ah7 لبكتريا *Aeromonas hydrophila*

الاختبار	النتيجة
B–galaclosidase	+
Arginine dihydrolase	+
Lysine decarboxylase	+
Ornithine decarboxylase	–
Citrate Utilization	+
H2s production	–
Urease	–
Tryptophane Deaminase	–
Indol Production	+
Acetone production	+
Gelatinase	+
Glucose fermentation /Oxidation	+
Mannitol fermentation /Oxidation	+
Inositol fermentation /Oxidation	–
Sorbitol fermentation /Oxidation	–
Rhamenose fermentation /Oxidation	–
Sucrosefermentation /Oxidation	+
Melibiose fermentation /Oxidation	–
Amygdalin fermentation /Oxidation	+
Arabinose fermentation /Oxidation	+

شكل (2) نتائج الاختبارات الكيموحيوية لنظام (API) لتأكيد هوية العزلة Ah7 لبكتريا *Aeromonas hydrophila*

وافقت نتائج التشخيص النتائج التي ذكرها Borchardtوآخرون في عام(2025) [20] الخاصة بتشخيص النوع *Aeromonas hydrophila*.

مقاومة عزلات *Aeromonas hydrophila* للمضادات الحيوية

أظهرت نتائج اختبار الحساسية لـ (16)مضاد حيوي تعود الى (7) مجموعات مختلفة من المضادات الحيوية شملت الأمينوغلايكوسيدات والبنسلينات والسيفالوسبورينات والببتيدات المتعددة والكونيولونات والماكروليدات والتتراسايكلينات، أن جميع عزلات *Aeromonas hydrophila* قيد الدراسة أبدت مقاومة متعددة لأغلب المضادات الحيوية المستخدمة، بلغت نسبة العزلات المقاومة للمضادات الحيوية Cefuroxime, Bacitracin ,Amoxycillin,Ampicillinو Cloxacillin Tetracycline, Flumequien, Penicillin G,Erythromycin, Cephalexin, نسبة 100 % في حين أبدت حساسية تامة بنسبة 100 %لكل منChlorotetracyclin و Azithromycin،

فيما تباينت نسب المقاومة للمضادات الحيوية : Amikacin ,Ciprofloxacin ,Gentamycin Streptomycin,إذ بلغت 14.29%، 50%، 21.43% و35.71 % على التوالي جدول (5).

جدول (5) أنماط المقاومة المتعددة من قبل بكتريا *Aeromonas hydrophila* المعزولة للمضادات الحيوية

رمز العزلة / اسم المضاد	Ah1	Ah2	Ah3	Ah4	Ah5	Ah6	Ah7	Ah8	Ah9	Ah10	Ah11	Ah12	Ah13	Ah14	عدد العزلات المقاومة للمضاد	%لمقاومة العزلات للمضاد
Amikacin	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	5	35.71
Amoxycillin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	14	100
Ampicillin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	14	100
Bacitracin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	14	100
Cefuroxime	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	14	100
Chlorotetra	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	O

cyclin																
Cloxacillin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	14	100
Cephalexin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	14	100
Ciprofloxacin	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	3	21.43
Azithromycin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0
Gentamycin	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	7	50
PenicillinG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	14	100
Erythromycin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	14	100
Flumequien	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	14	100
Tetracycline	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	14	100

Streptomycin	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	14.29	2
عدد المضادات المقاوم تل كل عزلة	13	13	11	11	10	10	10	10	14	13	12	11	11	13	13	10	10	10	10	10	10		
%لمقاومةالعزلة للمضاد	81.25	81.25	68.75	68.75	81.25	62	62.5	62.5	87.5	81.25	75	68.75	68.75	81.25	81.25	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5		

تتفق نتائج هذه الدراسة بالنسبة لمقاومة مضادات مجموعة البنسيلينات التي تضمنت Ampicillin, Amoxycillin, Cloxacillin,و Penicillin G مع نتائجAl-shammari و Al-niaemm في عام (2025) ، إذ أبدت كافة عزلاتهما من*Aeromonas hydrophila* البالغ عددها (73) معزولة من حالات مرضية مختلفة مقاومة بنسبة 100% إلى هذه المضادات، وتم تعليل سبب المقاومة المرتفعة لهذه المضادات إلى إنتاج إنزيم β- lactamase الذي يهاجم حلقة البيتالاكتام الموجودة في نواة هذه المضادات جاعلة منها مضادات غير فعالة وذلك بفعل مورثات مقاومة موجودة عند أغلب سلالات *Aeromonas hydrophila* وهيblaTEM,blaOxA, blaSHV المحمولة عادةً على الصبغي وأحياناً على البلاسميدات، ولتغير في نفاذية الغشاء الخارجي Outer membrane لهذه البكتريا [21]، أما نتائج الدراسة الحالية بالنسبة لمضادات

مجموعة Aminoglycoside التي تضمنت مضادات Amikacinو Gentamycinو Streptomycin فتخالفت مع نتائج الباحثانKaskhedikarو Chabraعام (2024)إذ أبدت عزلاتهما من *Aeromonas hydrophila*البالغ عددها(128) المعزولة من حالات مرضية مختلفة مقاومة بلغت 57.81%,73.43%,52.34% على التوالي[22]، قد يعود سبب الاختلاف في نسب المقاومة لهذه المضادات لاختلاف عدد عزلات *Aeromonas hydrophila* ولاختلاف الأعمار المستهدفة بالدراسة واختلاف الموقع الجغرافي [23].

يعود سبب مقاومة *Aeromonas hydrophila* لمضادات مجموعةAminoglycoside إلى إنتاجها لإنزيمات محورة كإنزيمي Phosphotransferase و N–acetyle transferase [24].

أما فيما يخص نتائج مقاومة مضادات مجموعة Cephalosporins التي تضمنت مضادي Cefuroxime(من مضادات الجيل الثاني) و Cephalexin(من مضادات الجيل الأول) فتتفق مع نتائج Vila وآخرون في عام (2002)

الذين وجدوا أن بكتريا *Aeromonas hydrophila* كانت مرتفعة المقاومة للمضادات الحيوية التابعة لمجموعة Cephalosporinsإذ بلغت 97.14%,89.41% على التوالي[25]، إن السبب الرئيسي لهذه المقاومة المرتفعة هو امتلاك بكتريا *Aeromonas hydrophila* *مضخات* دفق Efflux pumps (Es) ذات كفاءة في طرح مضادات هذه المجموعة خارج الخلية وإزالة تأثيرها الضار بالخلية، وكذلك لإنتاج انزيمات Cephalosporinase التي تحطم حلقة β– lactam الموجودة في تركيبة هذه المجموعة من المضادات بفعل مورثات المقاومة المتمثلة بـ bla CTX– ، blaAMPC و blaTEM [26]،أما بالنسبة لمقاومة مضادات مجموعة Macrolides التي تضم مضادي Azithromycin و Erythromycin في هذه الدراسة فقد وافقت نتائج Elbialy وآخرون في عام (2024) بإبداء كافة العزلات مقاومة تجاه المضادErythromycinإلاّ أنها خالفتهم فيما يخص المضاد Azithromycin إذ أبدت كافة عزلات *Aeromonas*

*hydrophila*قيد الدراسة حساسية تامة تجاهه، في حين بلغت نسبة مقاومة عزلاتهم من*Aeromonas hydrophila* 71.12%[27]، عزي سبب مقاومة عزلات *Aeromonas hydrophila* لمضادات مجموعة Macrolides المتمثلة بالمضاد Erythromycin إلى التحلل المائي hydrolysis للمضاد وتثبيط عمله، بالإضافة لامتلاكها أنظمة الدفق الناجمة عن فعل المورثات erm B و erm A و erm C و meFA [28]، أما بالنسبة لمقاومة عزلات *Aeromonas hydrophila*لمضاد Bacitracin فقد توافقت مع نتائج الباحثان Kaskhedikar و Chabra عام (2024)، إذ حصلا على مقاومة تامة بنسبة 100 % لعزلات *Aeromonas hydrophila*المعزولة من حالات سريرية مختلفة ولأعمار مختلفة و لكلا الجنسين [22]، يعود سبب المقاومة لهذا المضاد الى كونه مركب ببتيدي ذات وزن جزيئي كبير ضعيف المرور عبر قنوات Porins لذلك لا يصل بتراكيز فعالة الى الغشاء السيتوبلازمي، بالإضافة لوجود آليات إزالة سمية شائعة في سلالات *Aeromonas hydrophila* وهي أنظمة نقل مثل Bac A–like undecaprenyl pyrophosphate phosphatase تعمل على إعادة تدوير هدف الباستراسين وتقليل فعاليته بالارتباط بالهدف داخل البكتريا لذلك تعد هذه المقاومة مقاومة طبيعية وليست مكتسبة [23]، أما بالنسبة لمقاومة عزلات*Aeromonas hydrophila* لمضادات مجموعةQuinolones التي تضمنت مضاد Flumequien ومضادات Fluoro Quinolones التي تضمنت مضاد Ciprofloxacin في هذه الدراسة فقد توافقت مع نتائج دراسة الباحث Sadeghi وآخرون في عام(2023)إذ بلغت نسبة مقاومة عزلاتهم من *Aeromonas hydrophila* المعزولة من براز مرضى مصابين بالتهاب معوي ومن أعمار مختلفة في المكسيك 46.66%و66.66 %على التوالي، وبيّن أن سبب المقاومة لمضاد Flumequien الاستعمال المفرط لهذا المضاد الحيوي في المكسيك أدى إلى زيادة نسبة المقاومة بشكل ملحوظ، يعود سبب مقاومة بكتريا *Aeromonas hydrophila* لمضادات Quinolonesومضادات Fluoro

Quinolones إلى طفرة في DNA Gyrase بفعل مورثة المقاومة qnr gyr A تعمل على المضادFlumequien ومورثات المقاومة المتمثلة بـ qnr A و qnr B و gyr A, qnr S و Par C [21]، وفيما يخص نتائج مقاومة عزلات*Aeromonas hydrophila* لمضادات مجموعة Tetracyclines التي تضم مضادي Tetracyclineو Chlorotetracyclin فقد تباينت النسب بين الحساسية التامة لمضادChlorotetracyclin والمقاومة التامة للمضادTetracycline ولكافة العزلات قيد الدراسة، قد يعود السبب لاختلاف بنية المضادين، فالـChlorotetracyclin يحتوي على ذرة كلور في بنيته الكيميائية التي نزيد من قابلية الذوبان في الدهون وبالتالي تحسن اختراق المضاد الغشاء الخارجي للبكتريا سلبية الغرام، كما أن له قابلية ارتباط بكفاءة أعلى بموقع الارتباط على الوحدة 30S للأجسام الريبية، ولضعف كفاءة مضخات الدفق بطرده مما يؤدي لتراكمه داخل الخلية البكتيرية[22].

بشكل عام تعود المقاومة المرتفعة للتتراسايكلين لوجود مورثات مقاومة شائعة في سلالات*Aeromonas hydrophila* مثل tet B و tet E و tet A تشفر إلى مضخات دفق فعالة تطرد مضاد Tetracycline خارج الخلية، وللاستخدام الواسع للتتراسايكلين [28].

أنماط المقاومة المتعددة من قبل بكتريا *Aeromonas hydrophila* للمضادات الحيوية Resistance Profile (Antibiotype)

أظهرت كافة عزلات *Aeromonas hydrophila* قيد الدراسة البالغ عددها (14) عزلة مقاومة متعددة لمجاميع مختلفة من المضادات الحيوية، إذ أبدت عزلة واحدة هي (Ah7) مقاومتها لـ (14)مضاد حيوي، وثلاث عزلات هن (Ah1),(Ah2),(Ah6) قاومن (13) مضاد حيوي، وعزلة واحدة هي(Ah5) قاومت(12) مضاد حيوي وعزلتان هما (Ah3)و(Ah4) قد قاومتا (11) مضاد حيوي، وسبع عزلات هن (Ah8), (Ah9), (Ah10),(Ah11), (Ah13), (Ah14) (Ah12)

قاومن(10) مضادات حيوية، تراوحت النسبة المئوية للعزلات المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية المستخدمة قيد الدراسة بين 87.5% -62.5% ،(سبق توضيحها في جدول 3).

خالفت تلك النتائج ماتوصل له Elbialy و آخرون في عام (2024) إذ بلغت النسبة المئوية لعزلاتهم ذات المقاومة المتعددة والمعزولة من أسماك المياه العذبة الشائعة Telapia mossambica(Telapia) المصابة بمرض الجلد التقرحي بين 21% -44%، ربما يعود السبب إلى اختلاف عدد و مصادر العينات المشمولة بالدراسة[27].

- قياس التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibitory Concentration(MIC)

تم قياس التراكيز المثبطة الدنيا لمضادات مجموعة β- actam وللمضادين (Chlorotetracyclinو Azithromycin)، باستخدم مرق مولر هنتون (MHB) لاحتوائه على تراكيز متدنية من كل من كلوريد الصوديوم وشوارد الكالسيوم والمغنيزيوم لتجنب التداخل مع عمل بعض المضادات الحيوية، أظهرت العزلات مقاومة شديدة لمضادات مجموعةβ- lactamالتي تشمل مضادات البنسيلينات (PenicillinGو Ampicillin و Amoxycillin و Cloxacillin)ومضادات السيفالوسبورينات(Cephalexinو Cefuroxime)من خلال نموها بتراكيز وصلت أضعاف نقطة توقف المضاد (Break Point) والمثبتة من قبل CLSI عام(2005) وفقاً لما جاء في [15] والتي يعتمد عليها في حساب استجابة البكتريا للمضاد، تراوحت قيم (MIC) لمضادAmoxycillin بين (512-64) مكغ/مل و

(128->1024)مكغ/مل للمضادAmpicillin و(64-1024)مكغ/مل للمضادCefuroxime و(512-128) مكغ/مل للمضادCloxacillin و(64->1024)مكغ/مل للمضادCephalexin و(128->1024)مكغ/مل للمضادPenicillin G، لم تستجب أي عزلة لهذه المجموعة من

المضادات، في الوقت الذي استطاعت فيه كافة العزلات الاستجابة للمضادين Chlorotetracyclin وAzithromycin إذ سجلت قيم MIC منخفضة تراوحت بين(0.5– 0.125) مكغ/مل و(O.25– O.125)مكغ/مل على التوالي ، جدول(6).

وفقاً لهذه النتيجة أن المضادين Chlorotetracyclin و Azithromycin هما المضادان الفعالان ضد عزلات *Aeromonas hydrophila* المحلية وبأنهما ذو المدى الأقل في الMIC وهنا يجب التأكيد على الاستعمال الصحيح لهذين المضادين للحد من إبداء مقاومة البكتريا لهما.

وافقت نتائج حساب MIC لمضادات البيتالاكتام في هذه الدراسة نتائج Echeverria و آخرون في عام (1986)الذين وجدوا أن كافة عزلاتهم لم تستجب لمضادات البيتالاكتام التي شملت (Ampicillin و Amoxycillinو Cloxacillin) إذ عللوا السبب إلى استعمال جرع تحت علاجية من المضادات يؤدي إلى نشوء الطفرات تلقائياً، بالإضافة إلى مقدرة أغلب سلالات البكتريا السالبة لصبغة غرام على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاماز الكروموسومية أو المشفرة بلاسميدياً[19]،إلاّ أنها خالفت ما سجله كل من الباحثان Kaskhedikar و Chabraفي عام (2024) من قيمMIC لمضادات البيتالاكتام التي شملت(Cephalexin و Ampicillin و Amoxycillin و Cloxacillin Cefuroxime)والتي كانت أدنى من القيم التي سجلت في هذه الدراسة [22]، ربما يعود السبب إلى الاستخدام الواسع و العشوائي لهذه المضادات في بلدنا مقارنةً مع دول الغرب.

الجدول (6) التراكيز المثبطة الدنيا مقدرة بـ (مكغ/مل) لبعض المضادات الحيوية المستخدمة ضد عزلات*Aeromonas hydrophila*

Ah 14	Ah13	Ah12	Ah11	Ah10	Ah 9	Ah 8	Ah 7	Ah6	Ah5	Ah 4	Ah 3	Ah2	Ah1	اسم المضاد
256	128	256	128	64	128	256	512	128	128	64	64	512	256	Amoxycillin
256	128	512	256	512	256	512	1024<	1024	512	512	1024	1024	1024	Ampicillin
128	128	256	128	128	128	128	1024	512	512	64	64	512	512	Cefuroxime
o.125	o.125	o.5	o.5	o.125	o.125	o.5	o.25	o.5	o.25	o.125	o.125	o.25	0.25	Chlorotetracyclin
256	128	128	128	128	128	128	512	512	512	256	256	128	128	Cloxacillin
64	64	64	64	128	256	128	1024<	512	512	128	128	512	1024	Cephalexin
0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25	o.25	o.125	o.125	o.25	0.125	Azithromycin

Penicilli nG	>1024	1024	512	256	1024	10 24	25 6	25 6	128	256	256	256	256	25 6

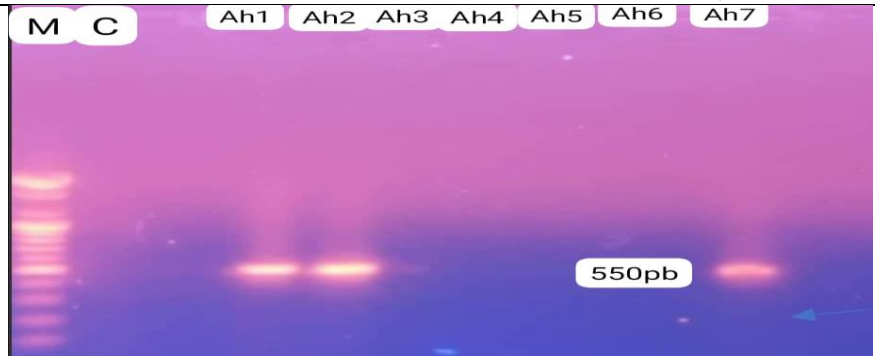
-الكشف عن المورثات المسؤولة عن إنتاج إنزيم lactamase -β في بكتريا *Aeromonas hydrophila* المقاومة للمضادات الحيوية:

تم الكشف عن وجود المورثتينblaAmpcو blaOxA المقاومتين للمضادات الحيوية اللتان تشفران لإنتاج إنزيم lactamase -β في العزلات (Ah1)،(Ah2)، (Ah3)،(Ah4)، (Ah5)، (Ah6)و (Ah7) لبكتريا *Aeromonas hydrophila* التي أبدت أعلى مقاومة للمضادات الحيوية المستخدمة باستعمال جهازPCR Thermal Cyecler، فبعد استخلاص Genomic DNA من العزلات السبعة المذكورة أعلاه، تراوحت درجة نقاوة ناتج DNA المستخلص (1.57- 1.91)، وبلغ تركيز ناتج DNA المستخلص من العزلات السبعة بين (72.1-97.1) نانوغرام/مايكرولتر جدول (7)، كما تم التأكد من نقاوة وتركيزالـ DNA الجينومي المستخلص بترحيله كهربائياً بهلام الأغاروز بتركيز1%، حيث أن زيادة تألق صبغة بروميد الإثيديوم عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية يشير الى أن الـDNA المستخلص كان بتركيز ونقاوة عالية.

جدول (7) نتائج قياس نقاوة وتركيز DNA المستخلص من عزلات *Aeromonas hydrophila*

Sample type ds DNA	Con(ng/µl)	Abs.280nm	Abs260nm	Abs260nm/280nm
Ah1	83.5	0.898	1.669	1.86
Ah2	72.1	0.81	1.442	1.78
AH3	87.1	0.97	1.741	1.79
Ah4	78.5	0.855	1.571	1.84
Ah5	89.6	1.138	1.792	1.57
Ah6	97.1	1.02	1.943	1.9
Ah7	81.8	0.855	1.636	1.91

أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي بهلام الأغاروز بتركيز 2% لنواتج تفاعل PCR للكشف عن المورثة blaAmpc في DNA بكتريا *Aeromonas hydrophila*، أن ثلاث عزلات من *Aeromonas hydrophila*هي:Ah1، Ah2 و Ah7 تمتلك القطع المضخمة من المورثة blaAmpc بنسبة42.86% وبعد المقارنة مع الحزم العائدة إلى الواسم الجزيئي المعياري DNA ladder، بلغ الوزن الجزيئي للحزم الناتجة 550زوج قاعدي، أما العزلات (Ah3)، (Ah4)،(Ah5) فلم تمتلك القطع المضخمة من المورثة blaAmpc ، شكل(3) .



الشكل (3) نتائج تفاعل الـPCR .يمثل المسار M مؤشرالأوزان الجزيئية(100,200,300,400,500,1000,2000 زوج قاعدي) وتمثل المسارات الأول والثاني و السابع نواتج الـPCR لـDNA بكتريا *Aeromonas hydrophila* الحاوية على القطع المضخمة من مورثة blaAmpc والمسارات الثالث و الرابع والخامس و السادس نواتج الـ PCR لـDNA بكتريا *Aeromonas hydrophila* غيرالحاوية على مورثةblaAmpc و C- شاهد سلبي.

وأن ثلاث عزلات هي Ah5 و Ah6 و Ah7 تمتلك القطع المضخمة من مورثة blaOxA مشكلة نسبة 42.86% ، بلغ الوزن الجزيئي للحزم الناتجة564 زوج قاعدي بعد المقارنة مع الحزم العائدة إلى الواسم الجزيئي المعياريDNA ladder ، شكل(4).

الشكل (4) نتائج تفاعل الـPCR يمثل المسار M مؤشرالأوزان الجزيئية (400,500,600,800,900,1000 زوج قاعدي) وتمثل المسارات الخامس و السادس و السابع نواتج الـPCR لـDNA بكتريا *Aeromonas hydrophila* الحاوية على القطع المضخمة من مورثة blaOxA والمسارات الأول والثاني والثالث و الرابع نواتج الـPCR لـDNA بكتريا *Aeromonas hydrophila* غيرالحاوية على مورثة blaOxA و C- شاهد سلبي.

من الملاحظ أن العزلة Ah7 قد امتلكت كلتا المورثتين blaAmpc و blaOxA ،وقد أبدت مقاومة متعددة للمضادات الحيوية إذ قاومت 14مضاد حيوي مشكلة أعلى نسبة مئوية للعزلات المتعددة المقاومة للمضادات في هذه الدراسة والبالغة 87.5 %،وأظهرت مقاومة شديدة لمضادات مجموعة البيتالاكتام المستخدمة في الدراسة إذ تراوحت قيم MIC لها(512->1024) مكغ/مل،على الرغم من عدم امتلاك بقية العزلات إلى هاتين المورثتين إلاّ أنهم أبدوا مقاومة مرتفعة لعدد من المضادات الحيوية مما يشير إلى امتلاكهم آليات مقاومة أخرى للمضادات الحيوية كالتغيير في نفاذية الغشاء الخارجي الذي يحتوي على فتحات بروتينية تسمىporinsإذ أن حدوث أي تغيير في مواقع هذه

الفتحات يؤدي إلى حدوث مقاومة لعدد من المضادات الحيوية، أولامتلاك أنظمة الدفق Efflux system التي تعمل على ضخ المضاد الحيوي خارج الخلية البكتيرية، أو نتيجة تحوير في الوحدة الصغيرة للأجسام الريبية (30)S[22].

قاربت نتائج هذه الدراسة النتائج التي توصل اليها الباحث Thomas وآخرون في عام (2009) إذ بلغت نسبة عزلاتهم من*Aeromonas hydrophila* التي تمتلك المورثة blaAmpc نسبة 65% [28]، وتوافق نتائج Vila وآخرون في عام (2002) إذ بلغت نسبة بكتريا *Aeromonas hydrophila*التي امتلكت مورثتي المقاومة للمضادات الحيوية 61 % وأكدوا أن العزلات البكتيرية الطافرة mutants التي تفقد المورثتين تظهر قابلية ضعيفة في مقاومة مجاميع متعددة من المضادات الحيوية أكثر من السلالات الأبوية الأصلية [25]،إلاّ أن نتائج هذه الدراسة خالفت النتائج التي توصل إليها Borchardtوآخرون في عام (2025) الذين حددوا نسبة انتشار المورثة blaAmpc78%في سلالات *Aeromonas hydrophila* المقاومة للمضادات الحيوية المتعددة والمعزولة من مصادر سريرية مختلفة [20]، ربما يعود سبب اختلاف نسب انتشار المورثة لاختلاف عدد و مصادر العينات المدروسة .

الاستنتاجات

– بينت نتائج الدراسة أن نسبة عزل بكتريا *Aeromonas hydrophila* من براز الأطفال المصابين بالتهاب الأمعاء 14.4%

–أظهرت جميع عزلات *Aeromonas hydrophila* مقاومة متعددة لأغلب المضادات الحيوية المستخدمة

-أبدت جميع عزلات *Aeromonas hydrophila* حساسية تامة إلى Chlorotetracyclinو Azithromycin

-أظهرت نتائج تفاعل الPCR أن 42.86 %من بكتريا*Aeromonas hydrophila* تمتلك كل من مورثة المقاومة blaOxAالبالغ وزنهاالجزيئي 564زوج قاعدي ومورثة المقاومة blaAmpc البالغ وزنها الجزيئي 550 زوج قاعدي.

التوصيات

-إجراء العديد من الدراسات الوبائية والجزيئية للكشف عن أسباب زيادة مقاومة *Aeromonas hydrophila* المعزولة من حالات سريرية مختلفة للمضادات الحيوية

– ضرورة إجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية وتحديد التركيز المثبط الأدنى لها قبل وصف الدواء

– نشر الوعي الصحي بين المواطنين حول الحد من استعمال المضادات الحيوية بدون وصفة طبية لمنع تطور المقاومة للمضادات الحيوية.

المراجع

1-DAS,B. and MUKHERJEE, S. 1997.Pathobiology of *Aeromonas* infection in Rohu,Labeo Rohita Fingerling. J.Aquacult.Vol.5,Pp:89-94.

2-FIGUERAS ,M.,ALDEA,M. ,FERNANDEZ,N. and GUARRO,J.2007.*Aeromonas* hemolytic uremic syndrome,A case and a Review of the Literature .Diag.Microbiol.Infect.Dis , Vol.58,pp:231-239.

3-JAUD,J.1991.Recent advances in the study of the taxonomy ,pathogenicity ,and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. Clin.Microbiol.Rev.Vol.4,pp:397-410

4-AGUIRRE-GUZMAN,G. and FILIPE,A.2000.Infections disease in Shrimp species with aquaculture potential Rec. Res.Develop.Microbiol.Vol.4,pp:333-348.

5-GHENGHESH,K.,EL-KHALEK,R.and KLENA,J.2008.*Aeromonas hydrophila*-associated infection in developing countries .J.Infect.Dev.Countries,Vol.2,no.2,pp:81-98.

6-GAVRIEL,A.A., LANDER, J.P.,and LAMB,A.J. 1998.Incidence of Mesophilic *Aeromonas* Within aPublic Drinking Water Supply in North-EastScotland, J.Appl.Microbiol.,Vol.84,PP:383-392.

7-CHOPRA ,A.and HOUSTON,C.1999.Enterotoxins in *Aeromonas* associated gastroenteritis. Microbes and Infection Vol.1,pp:1129-1137.6-

8-KOTLOFF,K.2016.*A. hydrophila*-associated Diarrhea in children under 5 years: The GEMS Experience.The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Vol.95,No.4,PP:774-780.

9-CHOPRA ,A. HOUSTON,C. and KUROSKLY,A. 1991. Genetic Variation in related cytolytic toxins produced by species of *Aeromonas* FEMS Microbiol.Lett.Vol.62,pp:231-237.

10-SARKAR,M.and THOMAS,P.2024. Characterization of *Aeromonas hydrophila* through RAPD-PCR and SDS-PAGE analysis. Open J.Med.Microbiol.Vol.7,pp:137-147.

11-.HOLT,J.G., KREIEG,N.R.,SNEATH,P.H.,STALEY,J.T.&WILLIAMS,S.T.1994-Bergey,sManual of Determinative Bacteriology. 9th edition. Williams &Wilkins,U.S.A. PP:190,254-259,1063.

12-QUINN,P.J.,CARTER,M.E.,MARKEY,B.,& CARTER,G.R.2004.Clinical Verterinary Microbiology,Mosby,Elsevier,London,Sec,2,pp:130-147.

13-محفوض،ندى. 2016 .الكشف عن انظيم البنسيلينيز من المسببات البكتيرية لخمجات العيون .مجلة جامعة حمص،المجلد 38 لعام 2016.

14-محفوض،ندى2023 . مقارنة الاشريكية القولونية المعزولة من عينات مرضية مختلفة مع تلك المعزولة من البراز . مجلة جامعة حمص .مجلد 45 لعام 2023.

15-WHO(World Health Organization).2003.Basic Laboratory Procedures in ClinicalBacteriology.2thed.Geneva, Switzerland.

16-MANIATIS,T.,FRITSCHAND,E.and SAMBROOK,J,1982. Molecular Cloning :Alaboratory Manual Cold Spring Harber Laboratory.New York.

17-HEYDARI,H.,IRANIKHAN,A.,GHASEMI,A.,MOHAMAD,A.,and KERMANI, S.2024.Evaluation of the Prevalence of *Aeromonas* spp.,*Compylobacter spp*. And *Clostridum difficile* in Immunocompromsed children with diarrhea BMC infections Diseases,vol.24,pp:512-521.

18-SADEGHI,H.,ALIZADEH,A.,VAFAIE,M.VAFAIE,M.and GHOLMZADEH ,K.2023. An Estimation of Global *Aeromonas* Infection Prevalence in Children with Diarrhoea:a systematic review and meta analysis.BMC pediatrics,vol.23,pp:254.

19-ECHEVERRIA,P.,TAYLOR,D.,LEKSOMBOON,V.and ROWE,B.1986.Clinical associations of *Aeromonas* spp. In fecal

specimens from children. Diagnostic Microbiology and infections Disease.vol.4,NO.4,PP:277-284.

20-BORCHARDT,M.,STEMPER,M.and STANDRIDGE,J. 2025. *Aeromonas hydrophila* isolates from human diarrheic stool.Emer.Infect.Dis.vol.11,no.7,pp:447-461.

21-Al-SHAMMARI,S.M. and AL-NIAEMM,K.S.2025. The Resistance of *Aeromonas* Bacteria to Antibiotics and the Effectiveness of Lactic Acid Bacteria Agianst Pathogenic strains in Cyprinus Carpiol.Egyptian J. of Aquatic Biology.vol.24.,NO.1,PP:747-758.

22-KASKHEDIKAR,M.andCHABRA,D.2024.Multiple Drug Resistance in *Aeromonas hydrophila* .Vet.World,Vol.6,No.9,pp:176-190.

23-DIASE,C.,MOTA, V.,MARTINES-MURCIA,A.and SAVEDRA,M. 2012.Antimicrobial Resistance Patterns of Aeromonas spp.J.Aquacult,Res.Dev.Vol.3,No.3,pp:1-7.

24-ODEYEMI,O.,ASMAT,A. and USUP,G.2023.Antibiotics Resistance and Putative Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila* isolated from Estuary.J.Microbiol.Biotechnol.Food Sci.,Vol.4,No.7,pp:1449-1457.

25- VILA ,J., MARCO,F. and SOLER,L.2002 In Vitro Antimicrobial Susceptibility of Clinical Isolates of *Aeromonas hydrophila* Biotype Sobria,J. Antimicrob,Chemother. Vol.49,pp:701-720

26-FIGUERAS ,M.J.,GUARRO,J. and MARTINEZ-MURACIA, A,J.2000. Clinical Relevant *Aeromonas* spp.Clin.Infect.Dis.Vol.30,pp:988-910.

27- ELBIALY,Z.,SALAH,A.,ELSHESHTAWY,A. and ABO-AL-ELA,H. 2024. Differential Tissue Regulation of nrF2/Keap1 Crosstalk in Response to *Aeromonas* infection in Nile Tilapia: Acomparative Study/. Aquaculture International, Vol. 32,No.1,pp:545-562.

28- THOMAS,P.,DIVYA,P.,CHANDRIKA,V.and PAULTON,M.2009. Genetic Characterization of *Aeromonas hydrophila* Using Protein Profiling and RAPD PCR. Asian Fish. Sci.Vol.22,pp:763-771.