دراسة وراثية لبكتريا *Aeromonas* المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز الصنف C

سامرة يونس يوسف،رشا عبد علي الخالدي , عبد الكريم القزاز

كلية العلوم، قسم التقنيات الاحيائية ،جامعة بغداد. بغداد – العراق.

الخلاصة

جمعت (507) عينة من مصادر سريرية وبيئية مختلفة. بعد اجراء الفحوصات المظهرية والكيموحيوية , اظهرت 17 عزلة عائديتها لجنس *Aeromonas* . اظهرت العزلتين *Aeromonas sobria* و *Aeromonas eucrenophila* فقط قدرتهما على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز الصنف C . بينت نتائج فحص الحساسية الدوائية تجاه 15 مضادا حيويا ان العزلتين تملك نمط المقاومة المتعددة ، اذ كانت العزلتين مقاومة للامبسيلين، والبنسيلين ج ، و الاموكسيسيلين ، والامبيكلوكس، واللنكومايسين، والسيفوكستين، والسيفوتاكسيم بينما كانتا حساستين لمضاد السفتازديم . تمت دراسة النسق البلازميدي للعزلتين المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز الصنف C ، واظهرت نتائج الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز ان العزلتين تملك حزم بلازميدية صغيرة. اظهرت نتائج تجارب التحول ان البلازميدات الصغيرة انتقلت الى بكتريا *E.coliMM294* ، مما يشير الى قابلية هذه البلازميدات على التعبير المظهري في اكثر من مضيف.

Abstract

Five hundreds and seven samples were collected from different environmental and clinical sources . Only, 17 isolates were belonging to the genus *Aeromonas* after doing morphological and biochemical tests .The ability of *Aeromonas* isolates to produce β-lactamase class C enzymes were tested, and the results showed that only two isolates (A . *sobria* and *A. eucrenophila*) produced this type of enzyme.The antibiotic scussptibility tests against 15 antibiotics were examined , and it was found that the two isolates were resistant to penicillin, ampicillin, ampiclox, amoxicillin, lincomycin, cefoxitin and cefotaxime, while they were sensitive to ceftazidime. Agarose gel electrophoresis showed that *Aeromonas* isolates have two small plamid bands . Transformation experiments revealed that the small plasmid bands were capable to transform *E. coli* MM294, an observation which indicates the ability of these plasmids to show their expression in more than one host

المقدمة

يضم جنس *Aeromonas* العديد من الانواع التي عرفت بامراضيتها للحيوانات لاسيما البرمائيات والزواحف و التي حينها لم تمثل أي تهديد لصحة وحياة الانسان و حتى الربع الاول من القرن الماضي، اذ عرفت حينها بامراضيتها للانسان بشكل لا يستهان به من احداث اصابات شديدة الخطورة في مختلف اعضاء الجسم. تسبب البكتريا اصابات للقناة الهضمية كما تسبب ايضا اصابات خارج معوية مهددة للحياة مثل: التهاب الجروح ، وانتان الدم فضلا عن دورها في الاصابات القلبية والتهابات العيون والمجاري البولية والمرارة والبريتون

واصابات الجهاز التنفسي والسحايا (1) .عزلت بكتريا *Aeromonas* من بيئات مختلفة وخاصة البيئة المائية، و كذلك من مدى واسع من الاغذية النباتية والحيوانية مثل: الاسماك واللحوم و الحليب ومنتجاته، لذلك تعد المياه والاغذية مصدراً لاصابة الانسان (2) . تملك هذه البكتريا العديد من عوامل الضراوة الفعالة في اصابتها للانسان والحيوان مثل: انتاج الذيفانات والانزيمات المختلفة، فضلا عن امتلاكها لنمط المقاومة المتعددة للعديد من المضادات الحيوية، مما يرشحها لتكون في مصاف الممرضات الشديدة الخطورة للانسان والحيوان(3) . تتميزهذه البكتريا بانتاجها للعديد من انزيمات البيتالاكتاميز البلازميدية والكروموسومية مما يجعلها مقاومة لمضادات البنسيلينات والسيفالوسبورينات والكاربابنيم، وهذا يجعل علاج الاصابات الناتجة من هذه البكتريا عملية صعبة، الامر الذي يزيد من خطورتها من الناحية السريرية (4)، لذا كان هدف البحث هو دراسة اسباب المقاومة المتعددة في هذه البكتريا ودورها في زيادة الامراضية عن طريق معرفة مواقع جينات البيتالاكتاميز الصنف C سواء اكانت كروموسومية ام بلازميدية لاختيار العلاج المناسب لها .

طرائق العمل

ا- العزلات البكتيرية :

جمعت 507 عينة من مصادر بيئية (مياه وتربة) وسريرية (براز و دم و عينات الجروح و ادرار و مسحات العيون) . اظهرت 17 عزلة عائديتها لجنس *Aeromonas* اعتمادا على الصفات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية حسب ما وصفه Macfaddin (5). استخدمت عدة اوساط للعزل (وسط اكارالدم والامبسلين و وسط اكار الدكسترين والامبسلين و وسط اكار النشا والامبسلين و وسط الماكونكي). اختيرت العزلتين (AR9) *A. eucrenophila* و *A .sobria* (AR7) لقابليتهما على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز الصنف C.

ب- اختبار الحساسية للمضادات الحيوية

اختبرت حساسية العزلتين البكتيريتين تجاه 15 مضاد حيوي والتي استخدمت بشكل أقراص وفقا للطريقة المذكورة من قبل Vandepitte **(6)** , تم قياس أقطار مناطق التثبيط حول كل قرص من أقراص المضادات الحيوية بوساطة المسطرة، ومقارنتهما مع الجداول القياسية الخاصة بتقرير National Committee for Clinical Laboratrry Standards (NCCLs) (7).

ت- الكشف عن انزيمات البيتالاكتاميز الصنف(C)

اجري هذا الكشف على العزلتين البكتيريتين وذلك بأتباع الطريقة المذكورة من قبل Collee *et al.* (8) .

ت-استخلاص الدنا البلازميدي

عزل الدنا البلازميدي من العزلتين *A .eucrenophila* و *A . sobria* وذلك بأتباع الطريقة المذكورة من قبل Kado and Liu (9) .

ج- الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز

تم الكشف عن النمط البلازميدي للعزلتين بعملية الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز حسب ما وصفه Maniatis (10), و فحص الهلام باستخدام مصدر للأشعة الفوق البنفسجية(Transilluminator) بطول موجي 354 نانوميتر ، و صور الهلام لغرض تحليل النتائج.

هـ- التحول البكتيري Bacterial Transformation

استخدم الدنا البلازميدي المستخلص من العزلتين لتحويل السلالة القياسية *E . coli* MM294 المقاومة للريفامبسين وذلك بأتباع الطريقة المذكورة من قبل Maniatis (10).

النتائج والمناقشة

تشخيص العزلات: اظهرت 17 عزلة عائديتها لجنس *Aeromonas* اعتمادا على الصفات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية , واختيرت العزلتين *A eucrenophila* (AR9) و *A sobria* (AR7) لقابليتهما على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز الصنف C .

ب-مقاومة بكتريا *Aeromonas* للمضادات الحيوية

فحصت قابلية عزلتي بكتريا *Aeromonas* على مقاومة المضادات الحيوية وذلك باستخدام 15 مضاداً حيوياً ، وتم تحديد مقاومتهما للمضادات الحيوية اعتماداً على قياس قطر منطقة التثبيط (بالمليمتر)، أظهرت النتائج المبينة في الجدول(1) إن النوعين البكتيرين المعزولين كانا مقاومين لمضادات البنسيلينات التي شملت البنسيلين ج ، والامبسيلين, والامبيكلوكس ، و الاموكسيسيلين ، و تعد هذه النتيجة طبيعية نتيجة للاستخدام الواسع والعشوائي لهذه المضادات، كما يعزى سبب المقاومة لهذه المضادات إلى قدرة البكتريا على إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز (البنسيلينيز) التي يشفر لها كروموسوميا

أو بلازميديا (11) . وأظهرت النتائج ايضا مقاومة النوع *A. eucrenophila* لمضاد السيفالوثين وهو من مضادات الجيل الأول من السيفالوسبورينات بينما اظهر النوع *A. sobria* حساسية تجاه مضاد السيفالوثين وتعد الحساسية لهذا المضاد صفة مميزة لهذا النوع (12). أما بالنسبة للجيل الثاني من السيفالوسبورينات، فقد بينت النتائج مقاومة العزلة *A. eucrenophila* لمضادي السيفيوروكسيم والسيفوكسيتين ، بينما كان النوع *A. sobria* حساسا لمضاد السيفيوروكسيم ومقاوما لمضاد السيفوكستين ، وتعود هذه المقاومة إلى قدرة البكتريا على إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز من نوع AmpC التي يشفر لها كروموسومياً وبلازميدياً او عناصر قافزة (Transposon) (14,13,4) .أما فيما يخص المقاومة للجيل الثالث من السيفالوسبورينات والمونوبكتام، فقد أظهرت بكتريا *A. eucrenophila* مقاومة لمضادات السيفوتاكسيم والسفترياكسون والازترونم وكانت حساسة لمضاد السفتازديم . وأظهرت *A. sobria* مقاومتها لمضاد السيفوتاكسيم بينما كانت حساسة لبقية المضادات. أدى استعمال هذه المضادات بشكل واسع إلى قدرة بكتريا *Aeromonas* على إنتاج أنزيمات بيتالاكتاميز والتي تمنحها القدرة على مقاومة الأجيال الجديدة من السيفالوسبورينات وهذا ما أشار إليه كل من Fosse (15) و Rasmussen and Hoiby (16) حول قدرة هذه البكتريا على إنتاج أنزيمات بيتالاكتاميز واسعة الطيف والتي تعمل على تحويل مضادات السيفالوسبورينات الواسعة الطيف إلى مركبات غير فعالة.أما فيما يخص الميروبنيم وهو من مضادات الكاربابنيم، فقد امتلكت *A. eucrenophila* قدرة على مقاومة هذا المضاد ، اذ اشارت دراسات عديدة الى قدرة البكتريا على إنتاج أنزيمات بيتالاكتاميز من نوع كاربابنيميز محللة لمضادات الكاربابنيم دون غيرها .اما *A. sobria* فكانت حساسة لهذا المضاد (17) . أما فيما يتعلق بمجموعة الامينوكلايكوسيدات فقد أظهرت النتائج ان بكتريا *A. eucrenophila* امتازت بمقاومتها لمضادين النيومايسين والجنتامايسين ، بينما كانت *A. sobria* حساسة لكلا المضادين .إن صفة المقاومة لهذه المضادات غالبا ما يكون سببها حدوث طفرة كروموسومية تعمل على تحوير المستلم الرايبوسومي أو ما يسمى بالموقع الهدف (S 30)(18)، أو نتيجة لوجود بلازميدات تحمل الموروثات المسؤولة عن المقاومة لهذين المضادين، وهذا ما أكده Borrego (19) الذي وجد بلازميدات صغيرة تحمل جينات مسؤولة عن المقاومة لمضادات الجنتامايسين والتوبرامايسين والكانامايسين في بكتريا *Aeromonas* ، كما وجدت بلازميدات اقترانية بأحجام مختلفة تحمل الموروثات المسؤولة عن المقاومة لهذه المضادات (20) أما مضاد اللنكومايسين، فقد أظهر كلا النوعين مقاومة لهذا المضاد، وتعزى هذه المقاومة إلى حدوث طفرات كروموسومية تؤدي إلى تغير الموقع الهدف الذي يعمل عليه المضاد وهو الرايبوسوم البكتيري (S 50) (18) . يتضح مما تقدم إن النوعين البكتيريين قيد الدراسة قد أظهرا صفة المقاومة المتعددة لأكثر من مضاد حيوي وتراوحت بين المقاومة لسبعة مضادات حيوية في العزلة *A. sobria* الى 14 مضاداً حيوياً في العزلة *A. eucrenophila*.

جدول (1) : نتائج فحص الحساسية الدوائية لبكتريا *Aeromonas*

العزلات	AR_7	AR_9
Penicillin	R	R
Ampicillin	R	R
Amoxicillin	R	R
Ampiclox	R	R
Cephalothin	S	R
Cefuroixme	S	R
Cefoxitin	R	R
Cefotaxime	R	R
Ceftriaxone	S	R
Ceftazidime	S	S
Aztronam	S	R
Meropenem	S	R
Neomycin	S	R
Gentamycin	S	R
Lincomycin	R	R

(R) مقاومة،(S)حساسة

ت-الكشف عن انزيمات البيتالاكتاميز الصنف C

اجري هذا الكشف للتحري عن قدرة بكتريا *Aeromonas* على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز الصنف C (AmpC باستخدام طريقة Collee *et al* (8) . ان تسطح دائرة التثبيط لقرص المضاد السفترياكسون الذي يعتبر محفز ضعيف لانتاج انزيمات البيتالاكتاميز الصنف C باتجاه قرص المضاد السيفوكسيتين المحفز القوي لانتاج هذه الانزيمات هو دليل على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز الصنف C (8) استطاعت العزلتين ان تظهر تسطح بمنطقة التثبيط لمضاد السفترياكسون

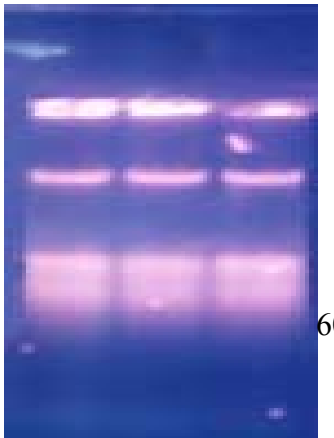
والازترونم باتجاه قرص مضاد السيفوكستين شكل (1) و تعد نسبة العزلات المنتجة لانزيمات AmpC منخفضة , اذ اشارت العديد من الدراسات الى قدرة بكتريا *Aeromonas* على انتاج هذا النوع من الانزيمات (4، 15), مما يؤهلها لمقاومة مضادات السيفالوسبورينات الجيل الثالث والمونوبكتام والسيفوكتين (21) وبالتالي صعوبة علاج الحالات المرضية التي تسببها هذه البكتريا (22) . تميزت هذه الطريقة بسهولتها وتخصصها , وهي من الطرائق المعتمدة في العديد من المختبرات العالمية لتحديد انزيمات البيتالاكتاميز الصنف C, يرافق اجرائها بعض الصعوبات مثل عدم ضبط المسافة بين الاقراص , حيث اشار Collee *et al* الى امكانية الحصول على نتائج واضحة عند الكشف عن انزيمات البيتالاكتاميز الصنف C بهذه الطريقة عندما تكون المسافة بين الاقراص تقريبا مرتين بقدر القطر الناتج من منطقة التثبيط في حالة استخدام مضاد السفترياكسون لوحده . كما اشارت احدى الدراسات الى امكانية استخدام اي من مضادات الاوكسي امينو بيتالاكتام كمحفزات ضعيفة في الكشف عن انزيمات البيتالاكتاميز الصنف C (23).

شكل (1) : فحص التحري عن انزيمات البيتالاكتاميز الصنف C

تظهر النتيجة الموجبة بتسطح منطقة التثبيط لمضادي السفترياكسونA والازترونم B باتجاه قرص المضاد السيفوكستين.

ث-النسق البلازميدي

تم التحري عن المحتوى البلازميدي لعزلتي *Aeromonas* المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز الصنف C ، وذلك لغرض التعرف على دور هذه البلازميدات في إنتاج هذه ألانزيمات . اعتمدت طرائق عديدة في استخلاص الدنا البلازميدي مثل: طريقة التحلل القاعدي (Alkaline lysis method (11)، وطريقة التمليح الخارجي(Salting out) المحورة من قبل Pospiech and Neuman, (24)، وكانت طريقة Kado and Liu (10) افضل هذه الطرائق، لامكانية الحصول على بلازميدات مختلفة الأحجام وجودتها في تحضير تراكيز عالية من الدنا ومن كميات قليلة من المزروع البكتيري (3 مليليتر) وتميزت أيضا بسرعتها، وقد اجري فيها تحويرا لغرض التخلص من تأثير أنزيمات النيوكلييز التي تنتجها بكتريا *Aeromonas* بكميات كبيرة التي لها تأثير كبير في خفض كفاءة استخلاص الدنا البلازميدي (25) ، وذلك بغسل الخلايا بدارئ STE و لاحتوائه على مادة (EDTA) Ethylene Diamine Titra Acitic Acid والتي تعمل على سحب الايونات المعدنية ثنائية التكافؤ الضرورية لعمل أنزيمات النيوكلييز، وكذلك للتخلص من متعدد السكريد الخارجي الذي قد يشكل مصدرا مهما لتلوث الدنا لاحقا (26) .أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لمستخلص الدنا الكلي للعزلتين على هلام الاكاروز شكل (2) احتواء العزلتين على حزمتين بلازميديتين صغيرتين وذات أوزان جزيئية مقاربة للوزن الجزيئي للبلازميد pBR 322 (4.3) كيلو زوج قاعدي و الذي استخدم دليلاً حجمياً .ان صفة إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميزالصنف C في بكتريا *Aeromonas* قد تكون محمولة على البلازميدات أو ربما تكون صفة كروموسومية. كما أشارت العديد من الدراسات إلى تباين عدد البلازميدات التي تحتويها بكتريا *Aeromonas* ، إذ تتراوح أعدادها بين 1-9 بلازميدات في سلالة واحدة، كما تتباين هذه البلازميدات في أوزانها الجزيئية اذ تتراوح بين 2-180 ميكادالتن، والتي لها دور مهم في إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز المختلفة والمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية(20,13) وتتصف بعض هذه البلازميدات بكونها اقترانية، وقد ينغرز فيها ترانسبوزون أو انتكرون (27، 28، 29).



شكل (2): الترحيل الكهربائي الهلامي

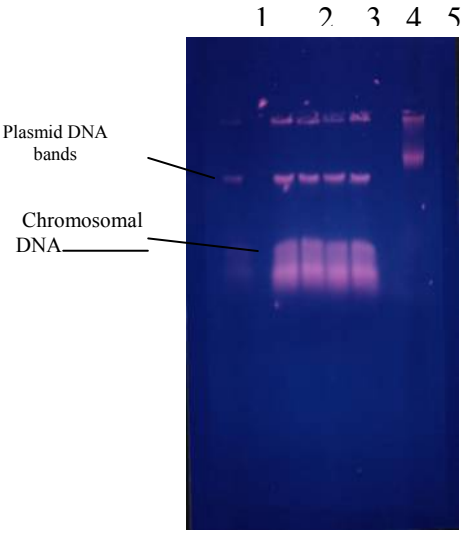
1- الدنا الكلي للسلالة القياسية *E.coli* HB101 الحاوية على البلازميد pBR322.
2- الدنا الكلي لبكتريا *Aeromonas eucrenophila*(AR9)
3-الدنا الكلي لبكتريا*Aeromonas sobria*(AR7)

ج- التحول الوراثي

حدد دور البلازميدات في إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز الصنف C في عزلات بكتريا *Aeromonas* من خلال إجراء تجربتين لتحويل السلالة القياسية *E.coli*MM294 المقاومة للريفامبسين . استخدم في التجربة الأولى الدنا الكلي المستخلص من العزلة *A. eucrenophila*. المقاومة للامبسيلين، والبنسيلين ج، والامبيكلوكس، والسيفالوثين، والاموكسيسيلين، والسيفوتاكسيم، والسفترياكسون، والسيفوكسيتين، والسفيوروكسيم، والميروبنيم، والنيومايسين، والجنتامايسين، واللنكومايسين. واستخدم في التجربة الثانية الدنا الكلي المستخلص من العزلة *A . sobria* المقاومة للامبسيلين، والبنسيلين ج، والاموكسيسيلين، والامبيكلوكس، والسيفوكستين ،والسيفوتاكسيم، واللنكومايسين، كما حولت السلالة القياسية نفسها بدنا البلازميد pBR 322 الذي يحمل مؤشرات المقاومة للامبسيلين والتتراسايكلين بوصفها سيطرة موجبة للتأكد من نجاح تجارب التحول المستخدمة.توضح النتائج المبينة في الجدول (2) الحصول على تردد تحول جيد من التجربتين (**1.3×10^{-6}** و **1.6×10^{-6}**) على التوالي قياساً مع تردد التحول باستخدام السيطرة الموجبة (1.3×10^{-5}) ، وكانت الخلايا المتحولة في التجربتين مقاومة لمضادي الامبسيلين والسيفالوثين الا انها غير منتجة لانزيمات البيتالاكتاميز الصنف C.أشارت نتائج احدى الدراسات التي استطاعت الحصول على خلايا متحولة مقاومة لمضادي الامبسيلين والسيفالوثين إلى إن هاتين الصفتين محمولة على بلازميدات صغيرة تتراوح إحجامها بين 2-5 كليو زوج قاعدي (30) . يتضح من نتائج الترحيل الكهربائي بهلام الاكاروز الشكل (3) امتلاك المتحولات المسار 3 و5 على النسق البلازميدي نفسه الذي تملكه العزلتين 2 و 4. وهذا يشير إلى إن صفة المقاومة لمضادي الامبسيلين والسيفالوثين محمولة على بلازميدات صغيرة مشابهة بحجمها للبلازميد pBR 322 ، وان هذه البلازميدات قادرة على التعبير المظهري في أكثر من مضيف. أما أنزيمات البيتالاكتاميز الصنف C فلم يتم انتقالها إلى السلالة القياسية وهذا ما تم تأكيده عند إجراء اختبار الكشف عن هذه الأنزيمات ، وقد يعود ذلك لوجودها على الكروموسوم البكتيري, اذ أشارت احدى الأدبيات العلمية إلى امتلاك بكتريا *Aeromonas* أنزيمات البيتالاكتاميز الصنف C وتحمل مؤشراتها الوراثية على الكروموسوم البكتيري (31) .

جدول (2) : نتائج تحول السلالة القياسية*Ecoli*MM 294 بالدنا الكلي المستخلص من العزلات *A . eucrenophila* و*A. sobria* والدنا الكلي المستخلص من السلالة القياسية*E.coliHB101* الحاوية على البلازميد *pBR322* .

مصدر الدنا البلازميدي المستخدم في التحول	المؤشرات الوراثية المنتقلة بالتحول	تكرار التحول
A .eucrenophila	المقاومة لمضاد الامبسيلين المقاومة لمضاد السيفالوثين	1.3×10^{-6}
A .sobria	المقاومة لمضاد الامبسيلين المقاومة لمضاد السيفالوثين	1.6×10^{-6}
*E.coli*HB101 الحاوية على pBR322	المقاومة لمضاد الامبسيلين المقاومة لمضاد التتراسايكلين	1.3×10^{-5}



شكل (3): الترحيل الكهربائي الهلامي .

1-الدنا الكلي للسلالة القياسية *E.coli*HB101 الحاوية على pBR 322

2- الدنا الكلي للعزلة *A.eucrenophila*(AR9)

3- الدنا الكلي للسلالة القياسية *E.coli*MM294 المتحولة بدنا العزلة *A.eucrenophila* .

4- الدنا الكلي للعزلة *A.sobria*(AR7)

5-الدنا الكلي للسلالة القياسية *E.coli*MM294 المتحولة بدنا العزلة *A..sobria*. الدنا الكلي للسلالة القياسية *E*

6- الدنا الكلي للسلالة القياسية *E.coli MM294*

المصادر

1. Merino , S . ; Rubires , X.; Knochel , S . ; and Tomas ,J .M .**1995** .*Emerging pathogens: Aeromonas spp*. . Int.J.Food Microbiol.28(2):157-168.
2. Yadav , A.S.; and Kumar, A.**2000** .*Prevalence of enterotoxigenic motile aeromonads in children , fish ,milk and ice-cream and their public health significance* . Southeast Asian J . 31 (1) : 153 -156.
3. Sen, K.; and Rodgers , M.**2004**. *Distribution of six virulence factors in Aeromonas species isolated from US drinking water utilities* : a PCR identification.J.Appl.Microbiol.97(5):1077 -1083.
4. Fosse, T.; Morin ,C.G.; Madinier ,I.; and Labia, R.**2003**.*Sequence analysis and biochemical characterisation of chromosomal cav-1 (Aeromonas caviae)the parental cephalosporinase of plasmid-mediated AmpC Fox, cluster*. FEMS Microbiol.Lett.222(1):93-98.
5. Macfaddin ,J.F.**2000**.*Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 3ed Lippincott Williams and Wilkins.
6. Vandepitte , J.; Engba , K.K.; Piot , P.; and Heuck , C.C.**1991**.*Basic laboratory producers in clinical bacteriology*. World Health Organization Geneva .
7. 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.
8. Collee, J.; Fraser, A.; Marmion , B.; and Simmons, A. **1996**. *Vibrio*, *Aeromonas* ,*Plesiomonas*, *Campylobacter , Arcobacter, Helicobacter*, *Wolinella* ,in Mackie and McCartney Practical Medical Microbiolgy . Longman Singapore.
9. Kado, C.L.; and Liu, S.T. **1981**.*Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid* J . Bacteriol .145:1365-1373.
10. Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; and Sambrook, J.**1982**.*Molecular cloning : a laboratory manual. Cold spring harbour laboratory* .Cold spring harbour , Newyourk.
11. Bakken, J.S.; Sanders, C.C.; Clark, R.B.; and Hori , M.**1988**.*B-lactam resistance in Aeromonas spp. Caused by inducible β-lactamases active against penicillins, cephalosporins and carbapenems* . Antimicrob. Agents Chemother . 32 (9) ; 1314-1319.
12. Carnahan, A.M.; Behram, S.; and Joseph, S.W.**1991**.*Aerokey aflexible key for*

23. Bradford, P . A . **2001** . *Extended spectrum B - lactamases in the 21 st century : characterization , epidemiology, and detection of this important resistance threat . Clin .Microbiol*.Rev.14(4):933-951.
24. Pospiech, J.; and Neuman , T.**1995**. *Preperation and analysis of genomic and plasmid DNA (ed Kieser ,T) Norwich* , u.k.
25. Lennette, E.H.; Balows, A.; Hausler, W.; and Shadomy, H.J.**1985**.*Manual of clinical microbiology .4Th ed. American society for micriobiology* . Washington.
26. Michon ,F .; Shaw ,D.H.; and Banoub , J . H . **1984** . *Structure of the lipopolysaccharide core isolated from ahuman strain of Aeromonas hydrophila* . Eur . J . Biochem . 145 :107-114.
27. Schmidt, A. S.; Bruun ,, M . S . ; Larsen , J . L.;and Dalsgaard, I . **2001** . Characterization of class 1 integrons *associated with R-plasmids in clinical Aeromonas salmonicida isolates from various geographical* areas . J . Animicrob.Chemother.47:735-743.
28. Fal, R.; Kaznowski, A. ; and Wlodarczak , K. **1991**.*Occurrence of conjugated R-plasmids in bacteria of Aeromonas genus isolated from purified urban sewage water* . Med . Dosw.Mikrobiol.43;37-41.
29. Lund, T.M.L.; and Sorum , H . **2000** . *Functional Tn 5393 –like transposon in the R plasmid pRAS pathogen Aeromonas salmonicida subspecies salmonicida* isol Norway.Appl. Environ. Microbiol. 66 (12) :5533-5535.
30. Al-Mehdi, L.K.**1998**. *Infantile bacterial diarrohea in relation to the type of feeding* .College of science .Baghdad university.
31. Thomson , K.S.**2001**.*Controversies about extended –spectrum and AmpC βeta-lactamases Emerg* .Infect. Dis . 7 (2) : 333-336.

identifying clinical Aeromonas species. J. Clin. Microbiol .29(12):2843-2849.

13. Chaudhury, A.; Nath, G.; Shukla, B.N.; and Sanyal,S.C.**1996**.*Biochemicalcharacterization ,enteropathogenicity and antimicrobial resistance plasmids of clinical and environmental Aeromonas isolates* . J . Med. Microbiol .44(6):434-437.
14. Philippon, A.; Arlet, G.; and Jacoby, G . A. **2002** . *Plasmid-determined Amp C - Type β - lactamases . Antimicrob* . Agents Chemother . 46(1):1-11.
15. Fosse,T.; Morin ,C.; Madinier, I.; Mantoux, F. ;Lacour ,J. P. ;and Ortonne, J.P.**2004** . *Aeromonas hydrophila 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* . Antimicrob . Agents Chemother . 48(6):2342-3.
16. Rasmussen , w . ; and Hoiby , N . **2004** . Cefotaxima*ses (CTX-Mases) ,an expanding family of extended-spectrum beta lactamases*. Can.J. Microbiol. 50(3):137-165.
17. Rasmussen, B.A. ; and Bush, K.**1997** .*Carbapenem hydrolyzing B-lactamases* . Antimicrob . Agents Chemother. 41 (2) : 223-232.
18. Brooks, G.F.; Butel , J.S.; and Morse, S.A.**1998**. *Antimicrobial chemotherapy .In medical microbiology (21 ed.) Typopress.*
19. Borrego ,J.J.; Morinigo , M.A.; Martinez-Manzanares, E.; Bosca , M.; Castro, D. ; Barja , J.L. ; and Toranzo , A.E. **1991**. *Plasmid associated virulence properities of environmental isolate Aeromonas hydrophila* . J.Med. Microbiol. 35(5):264-269.
20. Chang , B , J . ; and Bolton , S . M . **1987** . Plasmids and resistance to antimicrobial agents in *Aeromonas sobria* and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 31(8):1281-1282.
21. Bush, K.; Jacoby, G.A.; and Medeiros, A.A. **1995**. *Afunctional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure*. Antimicrob. Agents Chemother. 39 (6) : 1211-1233.
22. Joaquin, V.H.; Scribner, R. K.; Pickett, D. A.; and Welch , D.F.**1986**. Antimicrobial *susceptibility of Aeromonas* species isolated from patients with diarrhea . Antimicrob . Agents Chemother.30(5):794-795.