



## مقارنة بين تقانة تفاعل البوليميراز التسلسلي في الزمن الحقيقي والطرائق التقليدية في تمييز بعض أنواع البكتيريا الممرضة المعزولة من لحم الدجاج

### Comparison Between Real-Time Polymerase Chain Reaction Technique and Traditional Methods in Identification of Some Pathogenic Bacteria Isolated from Poultry

رضوان بدر الدين<sup>(1)</sup> عبد الحكيم عزيزية<sup>(2)</sup> ليلى الأمير<sup>(3)</sup>

R. Badr AL-Deen<sup>(1)</sup>

A. Azizieh<sup>(2)</sup>

L. AL-Amir<sup>(1)</sup>

(1) طالب دكتوراه، جامعة دمشق-كلية الزراعة-قسم علوم الأغذية.

(1) Ph. D. student, Damascus University-Agriculture Faculty-Department of Food Science.

(2) أستاذ في جامعة دمشق-كلية الزراعة-قسم علوم الأغذية.

(2) Professor, Damascus University-Agriculture Faculty-Department of Food Science.

(3) أستاذ مساعد في الهيئة العامة للتقانة الحيوية-قسم التقانات الصناعية والغذائية.

(3) Assistant Professor National Commission for Biotechnology-Department of Industrial and Food Technique.

#### المخلص

تعدّ البكتيريا الممرضة المنقولة عن طريق الأغذية سبباً أساسياً للأمراض أو الوفيات، وهناك تطور مستمر للطرائق السريعة والموثوقة للكشف عنها، حيث حلت التقانة الحيوية محل طرائق الاختبار التقليدية المكلفة والمجهدة والتي تحتاج لفترة طويلة لإظهار النتائج. أجري هذا البحث في مختبرات الهيئة العامة للتقانة الحيوية-قسم التقانات الغذائية والصناعية في الفترة الواقعة بين عامي 2013 و2014. تم الحصول على 53 عزلة للبكتيريا الممرضة من لحوم الدجاج باستخدام الطرائق التقليدية المعتمدة البكتريا المعزولة تنتمي إلى ستة أنواع، أغليبها العظمى (5 أنواع) من العائلة المعوية وهي واحد ينتمي إلى البكتريا سالبة غرام غير المعوية هو *Pseudomonas aeruginosa*. تم تمييز البكتريا السابقة باستخدام تقانة تفاعل البوليميراز التسلسلي في الزمن الحقيقي (Real-Time Polymerase Chain reaction) (RT-PCR) بالكشف عن مورثات *uidA*، *rpoB*، *ACC-1a*، *aad*، *invA*، *regA* في الأنواع السابقة على التوالي، باستخدام مرئسات مصممة لتحديد البكتريا على مستوى النوع بالاعتماد على منحنيات التآلق ودرجة انصهار الشدقات الناتجة. هدف هذا البحث إلى تقييم كفاءة طريقة RT-PCR في تمييز بعض أنواع البكتيريا الممرضة المعزولة من لحوم الدجاج باستخدام المرئسات المصممة في هذا البحث. وجد أن طريقة RT-PCR تمتاز بالدقة العالية والسرعة في تمييز الأنواع البكتيرية الممرضة المعزولة من لحوم الدجاج بحيث يمكن أن تصبح بديلاً عن الطرائق التقليدية المجهدة والبطيئة وعالية التكلفة.

**الكلمات المفتاحية:** طرائق التشخيص التقليدية للبكتيريا، تفاعل البوليميراز التسلسلي في الزمن الحقيقي، البكتيريا الممرضة، لحم الدجاج.

## Abstract

Foodborne bacteria are responsible for human illness and death. There is continuous development of rapid and reliable methods for the identification of these bacteria. Advent of biotechnology has greatly advanced food testing methods. This research was performed in the laboratories of National Commission for Biotechnology-Department of Industrial and Food Techniques in the period of 2013 to 2014. Fifty-three isolates of foodborne pathogenic bacteria were obtained from poultry samples using traditional methods based on morphological, physiological and biochemical tests. Identification tests revealed that the isolates ascribing 6 species, (almost all of them belonging to *Enterobacteriaceae*): *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Hafnia alvei*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* sp., and one species belonging to non-enterobacteriaceae gram-negative bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*. These isolates were identified by means of real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) technique, through detection of the genes *uidA*, *rpoB*, *ACC-1a*, *aad*, *invA*, and *regA*, respectively, using primer designed for identification of these bacteria to species level, depending on fluorescence and melting curves of the resulting amplicons. The current research aimed to evaluate the efficiency of RT-PCR in identifying of some foodborne pathogenic bacteria which are isolated from poultry. The results revealed that the RT-PCR technique was an accurate, rapid and inexpensive method for identification of pathogenic foodborne bacteria, and can replace labor intensive, lengthy and expensive traditional methods.

**Keywords:** Traditional Bacteria Identification Methods, Real-Time Polymerase Chain reaction, Foodborne Pathogenic Bacteria, Poultry.

## المقدمة

أدى إدخال تقانة تفاعل البوليميراز التسلسلي في الزمن الحقيقي (RT-PCR) في أبحاث الأمراض الوبائية المنقولة عن طريق الغذاء إلى إمكانية الكشف السريع عن العوامل الممرضة في المجالات الطبية والغذائية (Fenicia وزملاؤه، 2007)، وتلاحظ فوائد هذه التقانة عند التحديد الشامل والسريع للبكتيريا، لأن النتائج يمكن أن تعطي معلومات سريعة عن العامل الممرض المنقول عن طريق الغذاء، مما يسمح باستجابة سريعة وأكثر دقة وكفاءة (Fukushima وزملاؤه، 2009).

تتصف تقانة RT-PCR بالعديد من الميزات المهمة، فضلاً عن تقليل زمن الاختبار (تحتاج من 30 دقيقة إلى 2 ساعة فقط)، تُعدُّ هذه التقانة دقيقة وعالية التخصص، وتقدم إمكانيةً للتحليل الكمي (Mackay، 2004؛ Dorak، 2010)، بالإضافة إلى أن احتمال التلوث العرضي (Cross-contamination) محدود جداً، لعدم ضرورة فتح أنبوب التفاعل عندما يبدأ التضاعف، وإمكانية الأتمتة إذ أنها لا تحتاج لأية معاملات بعد تفاعل البوليميراز التسلسلي (Kalland، 2009؛ Fricker وزملاؤه، 2007)، إذ تحول النتائج إلى أرقام فوراً وتحلل باستخدام الخوارزميات الحاسوبية القياسية، وهذا يقلل من الأخطاء البشرية، ويعطي نتائج الاختبار في غضون ساعة واحدة من بدء التحليل بينما يأخذ التحليل بتقانات PCR التقليدية ساعات عديدة (Kalland، 2009).

تتوفر طريقتان مختلفتان للكشف عن منتجات PCR في الزمن الحقيقي هما: المسابر المتفلورة التي ترتبط بشكل نوعي بتسلسل محدد للـ DNA، والأصبغة المتفلورة التي تُدخَل إلى أي جزء من سلسلة الـ DNA المزدوجة، وقد تم إجراء اختبارات RT-PCR المعتمدة على المسابر المتفلورة للكشف عن العوامل الممرضة المنقولة عن طريق الغذاء باستخدام مسابر TaqMan (Hoorfar وزملاؤه، 2000؛ Iijima وزملاؤه، 2004)، وتتطلب طريقة TaqMan PCR توافر المرئسات والمسابر المنتقاة وفقاً لمعايير صارمة، ويمكن التغلب على هذه القيود باستخدام الطريقة الأقل كلفة وهي (SG-

(PCR) حيث تستخدم صبغة SYBR Green I التي ترتبط بسلسلة الـ DNA المزدوجة للكشف عن نواتج التضاعف، وبذلك يمكن تطبيق تقانة RT-PCR دون الحاجة إلى المسابر المتطورة (Aarts وزملاؤه، 2001)، ويقوم تخصص التفاعل على أساس درجة حرارة الانصهار ( $T_m$ ) بغياب المسابر (Oliveira وزملاؤه، 2005)، وتتضمن ميزات طريقة SG-PCR المتفوقة على طريقة TaqMan PCR البساطة النسبية وقلة تكلفة SYBR Green I مقارنةً بمسابر TaqMan (Nogva وزملاؤه، 2000).

تعتمد طريقة RT-PCR على مراقبة إصدار التآلق خلال تفاعل البلمرة التسلسلية لكل دورة مباشرة بعكس طرائق PCR التقليدية، فهي لا تحتاج إلى الرحلان على Agaros gel أو إلى استخدام المواد المشعة كمادة Ethidium bromide (Dorak، 2010). قام Vliegen وزملاؤه (2006) بتصنيف أنواع مختلفة من البكتيريا الممرضة باستخدام تقانة RT-PCR، شملت 3 أنواع تابعة لكل من الأجناس *Aeromonas*، *Clostridium*، *Enterococcus*، ونوعين لكل من الأجناس *Klebsiella*، *Proteus*، *Enterobacter*، *Citrobacter*، *Bacillus*، و10 أنواع تابعة للجنس *Corynebacterium*، و11 نوعاً تابعاً للجنس *Staphylococcus* بدقة 99 إلى 100 %.

تتميز بكتيريا العائلة المعوية (*Enterobacteriaceae*) بكونها عصيات سالبة الغرام تضم مجموعة تسمى بالبكتيريا المعوية وهي جزء من الفلورا الطبيعية في الأمعاء، إلا أن عدداً من أنواعها يسبب الإصابة بالأمراض المختلفة مثل التهاب الرئة وأمراض الجهاز البولي، علاوةً على أنها تُعدُّ من أهم مسببات التهاب الجروح وتعفن الدم والتهاب السحايا (Anbazhagan وزملاؤه، 2010)، وقد وجد أن بكتيريا العائلة المعوية تشكل الأغلبية العظمى للبكتيريا سالبة الغرام الهوائية أو اللاهوائية اختياريًا المعزولة في حالات الأمراض المعوية، وأن بكتيريا *E. coli* هي النوع الأكثر عزلاً (Rossi وزملاؤه، 2006)، ولديها القدرة على إحداث المرض وإفراز السموم، ومن أهمها Shiga toxin (Stx 1) و Stx 2)، والمورثة المسؤولة عن تشفيرهما هي uidA (Monday وFeng، 2000). وجد أن أهم الأنواع الممرضة التابعة للجنس *Enterobacter* هي *E. cloacae*، *E. aerogenes*، و *E. agglomerans* (Ye وزملاؤه، 2006)، ويمكن أن تستخدم المورثة rpoB المسؤولة عن تشفير الوحدة الفرعية  $\beta$  للـ RNA بوليميراز ( $\beta$ -RNA polymerase subunit) (Delmas وزملاؤه، 2006) في التمييز بين الأنواع ضمن العائلة المعوية بما فيها الجنس *Enterobacter*، وهي جزء من الجينوم المركزي (core genome) لبكتيريا الجنس *Enterobacter* (Hardoim وزملاؤه، 2013)، كما يمكن أن تُستخدم في تحليل القرابة الوراثية (phylogenetic analyses) وتحديد نوع البكتيريا، ولا سيما عند دراسة الأنواع شديدة القرابة (Adékambi وزملاؤه، 2009).

تمثل البكتيريا التابعة للجنس *Salmonella* أخطاراً صحية كبيرة، حيث تسبب بكتيريا *S. typhi* مرض داء السالمونيلا (Salmonellosis) عند الإنسان والحيوانات كما تُعدُّ العامل المسبب للحمي التيفية (Anbazhagan وزملاؤه، 2010)، ويمكن تحديد بكتيريا الجنس *Salmonella* من خلال المورثة *invA* المحفوظة للغاية والمتوضعة في الجزيرة الإمبراضية الأولى (pathogenicity island 1) (Hyland وزملاؤه، 2006) والمسؤولة عن تشفير البروتين الغزوي (invasivity protein) (Del Cerro وزملاؤه، 2003). وجد Segura وزملاؤه (2004) أن منتجات المورثتين *invA* و *invH* ضرورية لغزو الخلايا الظهارية في الزجاج (*in vitro*) والضراوة التامة (full virulence) في الفئران الملقحة عن طريق الفم، وخلال الإصابة بداء السالمونيلا ينسب غزو بكتيريا *Salmonella* إلى عدد من المورثات الغزوية إحداها المورثة *invA* (Khan وزملاؤه، 2007). ويبدو أن المورثة *invA* المسؤولة عن غزو خلايا العائل موجودة عند تحت الأنواع التابعة لـ *S. enterica* كافةً. وقد استُخدمت بشكل مكثف في الكشف النوعي عن بكتيريا الجنس *Salmonella* باستخدام تقانات PCR (Vollenhofer-Schrumpf وزملاؤه، 2007).

توجد بكتيريا *Proteus* في أمعاء الإنسان والحيوانات والسماد العضوي والتربة والماء الملوث ويسبب النوع *P. mirabilis* الأمراض للإنسان، بالإضافة إلى كونه عاملاً ثانوياً في التهاب الجروح، وهو مسؤول عن التهاب القناة البولية (Garrity، 2009)، وترتبط قدرة هذا النوع على إحداث المرض السابق بإفرازه أنزيم Deaminase الذي يقوم بحلقة البولة مما يؤدي إلى تكوين الحصيات الكلوية والمورثة المسؤولة عن تشفير الأنزيم السابق هي المورثة *aad* (Amino acid deaminase) (Burrall وزملاؤه، 2004). افترض Evanylo وزملاؤه (1984) أن إنتاج أحماض  $\alpha$ -كيتو من الأحماض الأمينية مرتبط بفعالية أنزيم Deaminase في بكتيريا *P. mirabilis* وله دور في استخلاص (chelation) الحديد (Evanylo وزملاؤه، 1984)، وقد توجهت الدراسة التي قام بها Massad وزملاؤه (1995) للتحقق من استخدام البكتيريا السابقة حمض  $\alpha$ -كيتو كعامل استخلاص لأنزيم Deaminase.

توجد بكتيريا النوع *Hafnia alvei* في التربة والمياه العادمة ومياه الشرب ومنتجات الألبان وتسبب بعض سلالاتها الإصابة بالإسهال (Garrity، 2009)، وتُعدُّ المورثة ACC-1a الموجودة في هذا النوع مسؤولة عن تشفير أنزيم  $\beta$ -lactamase من النمط C (AmpC) الذي يعمل على تفكيك الصادات الحيوية التي تنتمي إلى الجيل الثالث من cephalosporins (Ben Aissa وزملاؤه، 2011).

تسبب بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* الأمراض للإنسان وتستوطن في كل مكان من الطبيعة (Zhang وزملاؤه، 2012)، وهي بكتيريا ممرضة انتهازية تسبب العدوى في المستشفيات، وهي السبب الرئيس في حدوث التليف الكيسي (Cystic fibrosis) المؤدي إلى الموت، والالتهابات البولية والرئوية الناتجة عن المنفسة، والتهاب القرنية، والتهاب الأذن الظاهرة، والتهاب الجروح الناتجة عن الحروق وغيرها (Benamara وزملاؤه، 2011). وتنتج شدة العدوى من قدرة بكتيريا *P. aeruginosa* على إنتاج ترسانة من عوامل الضراوة المرتبطة بالخلية أو خارج الخلية (Woods و Vasil، 1994؛ Govan و Deretic، 1996؛ Frank، 1997؛ Sato و Frank، 2004)، ويُعدُّ الذيفان الخارجي A (Exotoxin A) (ETA) من بين عوامل الضراوة الخارجية (Pollack، 2000)، لأن إنتاج ETA يثبط اصطناع البروتين مما يؤدي إلى موت خلايا العائل (Kabat و Iglewski، 1975)، وقد أثبتت كل من الدراسات السريرية والتجارب على الحيوانات أهمية ETA في الإصابة بالعدوى، وعلاوة على ذلك فقد أثبتت التجارب على الحيوانات أن الطفرات التي تثبط إنتاج ETA تجعل السلالات الطافرة أقل ضراوة (Fogle وزملاؤه، 2002)، ويُنتج إنتاج ETA عن طريق العديد من عوامل الوسط المختلفة، التي تشمل درجة الحرارة ومستوى الحديد في وسط النمو، وكذلك يتأثر إنتاجه بالعديد من المنظمات الإيجابية والسلبية (Hamood وزملاؤه، 2004)، وتُعدُّ المورثتان *regA* (المورثة الإيجابية لتنظيم إنتاج ETA) و *pvdS* وهي مورثة العامل سيغما لنقص الحديد (Iron-starvation sigma factor) أكثر المورثات الإيجابية تحليلاً (Vasil و Ochsner، 1999؛ Hamood وزملاؤه، 2004)، لأن *regA* يعزز نسخ *toxA* على الرغم من أن الآلية التي يحدث هذا التعزيز من خلالها غير واضحة بشكل كامل (Hamood و Iglewski، 1990؛ Raivio وزملاؤه، 1996)، إلا أن البراهين أوحى بأن تعزيز *toxA* يحدث من خلال *regA* (Hamood وزملاؤه، 2004)، وعلى العكس يكبح الحديد نسخ *pvdS*، وبالتالي يقلل نسخ *regA* و *toxA* (Vasil و Ochsner، 1999؛ Hamood وزملاؤه، 2004).

يهدف البحث إلى المقارنة بين تقانة RT-PCR التي تستخدم صبغة SYBR Green I والطرائق التقليدية المعتمدة على الاختبارات المورفولوجية والبيوكيميائية في تشخيص بعض أنواع البكتيريا الممرضة المعزولة من لحوم الدجاج، لكون الطريقة الأولى تمتاز بالدقة العالية والسرعة وانخفاض التكاليف نسبياً بهدف الاستغناء عن الطرائق التقليدية كونها باهظة التكاليف ومجهدة وتحتاج إلى وقت طويل لإعطاء النتائج.

## مواد البحث وطرائقه

### 1- جمع العينات والحصول على العزلات البكتيرية:

جمعت عينات لحوم الدجاج من مدينة دمشق وريفها في الفترة الواقعة بين عامي 2013 و2014 باستخدام أكياس معقمة، وحُفظت بدرجة حرارة -20 ° م لحين الاختبار، وعُزلت البكتيريا التابعة للعائلة المعوية (عدا بكتيريا الجنس *Salmonella*) بوزن 25 غ من العينة في كيس معقم، وإضافة 225 مل من وسط Buffered Peptone Water (BPW) (SRL, Sisco Research Laboratories, Mumbai, India) والتحصين على درجة حرارة 37 ° م لمدة 20 ساعة، حُطِّطت كمية 200  $\mu$ L من المرق على أطباق MacConkey agar (Criterion, Hardy) (Diagnosics, Santa Maria, CA, USA)، وحُضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 ° م لمدة 24 ساعة (Kilonzo-Nthenge، 2008). عُزلت بكتيريا الجنس *Salmonella* وفقاً لـ (Harrigan، 1998)، وذلك بإضافة 25 غ من المنتج الغذائي إلى 225 مل BPW والمزج بشدة، والتحصين لمدة 24 ساعة على الدرجة 37 ° م، ثم إضافة 10 مل من مزرعة وسط الإغناء الأولي (BPW) إلى 100 مل من وسط Rappaport-Vassiliadis (RV) (Merck)، وحضن الوسط على درجة حرارة 42 ° م لمدة 24 ساعة، ثم حُطِّطت حمولة حلقة تلقيح على أطباق Xylose lysine desoxycholate (XLD) و Hektoen Enteric agar (HEA) (HiMedia, India).

عُزلت بكتيريا *P. aeruginosa* على وسط Cetrinide agar (CA) (Criterion, Hardy Diagnostics, Santa ) وفقاً لـ (Maria, CA, USA) (1998) Harrigan. وذلك بتحضير سلسلة تخفيف عشرية من المادة الغذائية في محلول 0.1% ببتون، ثم وزع 0.1 مل من كل تخفيف على طبق CA باستخدام ناشر زجاجي معقم، وحُضنت الأطباق بداية على درجة حرارة 25 ° م لمدة 4 ساعات ثم على حرارة 41 ° م لمدة 44 ساعة. أُجريت اختبارات الأوكسيداز، والكاتالاز، والحركة، وأكسدة / تخمير الجلوكوز (OFF-Glucose). تم تحديد العزلات الناتجة جميعاً باتباع الاختبارات المورفولوجية والبيوكيميائية وفقاً لـ (Garrity, 2009) المبينة في الجدول 1.

## 2- استخلاص الـ DNA من البكتيريا المعزولة وقياس نقاوته وتركيزه:

تم استخلاص الـ DNA من المزارع النقية للبكتيريا النامية على وسط Sigma-(LBB) Luria Bertani Broth (Sigma-Aldrich, Chemie, Gmbh, Germany) لمدة 24 ساعة باستخدام مجموعة Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (Promega Corporation, Madison, USA) وفقاً لتعليمات الشركة الصانعة.

حُدثت نقاوة الـ DNA المستخلص بقياس الامتصاص على طول الموجة 280/260 نانومتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي RT-PCR (Mecasys Inc., Korea) Optizen 3000 Plus وُعِدَّ الرقم بين 1.8 و 2.1 مناسباً للتحليل بجهاز PCR (Findlay, 2011). تم قياس تركيز الـ DNA المستخلص من خلال المعادلة التالية (Jain, 2004):

$$\text{التركيز} = \text{الكثافة الضوئية عند } 260 \text{ نانومتر} \times \text{معامل التمديد}$$

وتم ضبط تركيز الـ DNA المستخلص عند 25 بيكومول / ميكرو لتر

## 3- تحديد البكتيريا المعزولة باستخدام تقانة تفاعل البوليميراز التسلسلي في الزمن الحقيقي:

### - تصميم المرئسات المستخدمة في تحديد البكتيريا باستخدام جهاز RT-PCR:

تم تصميم المرئسات باستخدام قاعدة بيانات بنك المورثات (Gen.Bank) من الموقع (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)، وببين الجدول 1 المرئسات المصممة في هذا البحث لتحديد أنواع البكتيريا المدروسة، حيث استُخدم المرئس الأمامي المكون من 23 زوجاً قاعدياً (bp) والمرئس الراجع المكون من 21 bp لاستهداف المورثة uidA بالنسبة لبكتيريا *E. coli*. تم استهداف المورثة rpoB في بكتيريا *E. cloacae* باستخدام المرئس الأمامي المكون من 23 bp، والمرئس الراجع المكون من 25 bp. حُدد النوع *H. alvei* بالكشف عن المورثة ACC-1a باستخدام المرئسات الأمامي، والراجع الذي يتكون كل منها 22 bp. تم الكشف عن المورثة aad لتحديد بكتيريا *P. mirabilis* باستخدام المرئسين الأمامي والراجع اللذين يتكونان من 20 bp لكل منهما. استُهدفت المورثة invA في بكتيريا الجنس *Salmonella* باستخدام المرئسين الأمامي والراجع المكون كل منهما من 21 bp. وتم تحديد النوع *P. aeruginosa* بالكشف عن المورثة regA بواسطة المرئسين الأمامي والخلفي المكون كل منهما من 21 bp.

### تحضير العينات للتحليل بجهاز RT-PCR:

تم تحضير العينات للتحليل بجهاز RT-PCR (Spartan Bioscience Inc., Ottawa, Spartan DX-12<sup>TM</sup>) باستخدام مجموعة Maxima SYBR Green qPCR Master MiX (Thermo Scintific) وفقاً لتعليمات الشركة الصانعة بمزج 12.5 µL من SYBR Green Master Mix و 1 µL لكل من المرئسات الأمامي والراجع (تركيز 25 µL/pmol) والـ DNA المستخلص و 9.5 µL ماءً معقماً منزوع الشوارد خالٍ من الـ DNase في أنبوب PCR خاص بالجهاز المستخدم.

استُخدم البرنامج الحراري لتضخيم المورثة المستهدفة لبكتيريا *E. coli* على الشكل التالي: المسخ الأولي على درجة حرارة 92 ° م لمدة 10 دقائق، ثم 35 دورة: مسخ على درجة حرارة 94 ° م لمدة دقيقة واحدة، وارتباط على درجة حرارة 58.8 ° م لمدة دقيقة واحدة، والاستطالة على درجة حرارة 72 ° م لمدة 45 ثانية. واستُخدم البرنامج الحراري ذاته لبقية الأنواع لكن بتغيير درجة حرارة الارتباط لتصبح 60.8، 53.5، 50.3، و 50.9 و 53.8 ° م للأنواع *E. cloacae*، *H. alvei*، *P. mirabilis*، *Salmonella spp.* و *P. aeruginosa* على التوالي. تم تحديد قيمة درجة

انصهار الشدافات الناتجة ( $T_m$ ) باستخدام البرنامج الحراري التالي: 55–95 °م، ثم 95–55 °م بمعدل 0.10 °م لكل خطوة.

الجدول 1. تسلسل المرئسات المصممة والمورثات المستهدفة لأنواع البكتيريا الممرضة المعزولة من لحوم الدجاج.

| النوع                  | المورثة المستهدفة | تسلسل المرئسات   |
|------------------------|-------------------|--|
| <i>E. coli</i>         | uidA              | F: 5'- TGG TGA TTA CCG ACG AAA ACG GC-3'<br>R: 5'- ACG CGT GGT TAC AGT CTT GCG-3'      |
| <i>E. cloacae</i>      | rpoB              | F: 5'- AAG GCG AAT CCA GCT TGT TCA GC-3'<br>R: 5'-TGA CGT TGC ATG TTC GCA CCC ATC A-3' |
| <i>H. alvei</i>        | ACC-1a            | F: 5'- GCG TAA AAA AAT GCA GAA CAC A-3'<br>R: 5'-CCC TTC CAA TGA GCT CAG GAT T-3'      |
| <i>P. mirabilis</i>    | aad               | F: 5'- CGC TAT TAA CCT TGC TGA AC-3'<br>R: 5'-CCT TTC TCA CTC ACC ACATC-3'             |
| <i>Salmonella spp.</i> | invA              | F: 5'- TAC TTA ACA GTG CTC GTT TAC-3'<br>R: 5'- ATA AAC TTC ATC GCA CCG TCA-3'         |
| <i>P. aeruginosa</i>   | regA              | F: 5'- TTC CCT CGC AGA GAA AAC ATC-3'<br>R: 5'- CCT GGT TGA TCA GGT CGA TCT-3'         |

### النتائج والمناقشة

1- أنواع البكتيريا المعزولة: وجد أن البكتيريا المعزولة تنتمي إلى أنواع مختلفة هي *E. coli* (17 عزلة)، و *E. cloacae* (8 عزلات)، و *H. alvei* (5 عزلات)، و *P. mirabilis* (9 عزلات)، و *Salmonella spp.* (4 عزلات)، و *P. aeruginosa* (10 عزلات) بنتيجة الاختبارات المورفولوجية والبيوكيميائية المبينة في الجدول 2.

الجدول 2. الاختبارات المورفولوجية والبيوكيميائية لأنواع البكتيريا المعزولة من لحوم الدجاج.

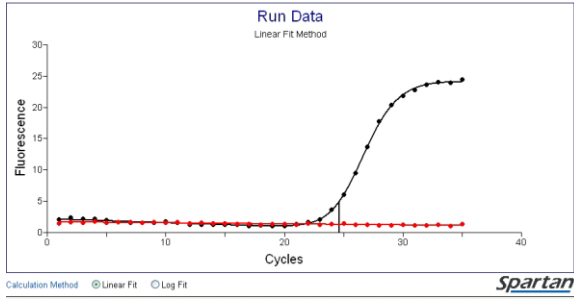
| الاختبار                   | النوع                   |                        |                     |                 |                   |                |
|----------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------|-----------------|-------------------|----------------|
|                            | <i>P. aeruginosa</i> ** | <i>Salmonella spp.</i> | <i>P. mirabilis</i> | <i>H. alvei</i> | <i>E. cloacae</i> | <i>E. coli</i> |
| صبغة غرام                  | عصيات سالبة             | عصيات سالبة            | عصيات سالبة         | عصيات سالبة     | عصيات سالبة       | عصيات سالبة    |
| اختبار الأوكسيداز          | +                       | -                      | -                   | -               | -                 | -              |
| اختبار الحركة              | +                       | +                      | +                   | +               | +                 | +              |
| اختبار كاتالاز             | +                       | +                      | +                   | +               | +                 | +              |
| أكسدة/تخمير الجلوكوز       | أكسدة                   | أكسدة/تخمير            | أكسدة/تخمير         | أكسدة/تخمير     | أكسدة/تخمير       | أكسدة/تخمير    |
| إنتاج إندول من تريبتوفان   | -                       | -                      | -                   | -               | -                 | +              |
| اختبار فوغس - بريسكاور     | *                       | -                      | -                   | -               | +                 | -              |
| استخدام السترات            | +                       | -                      | +                   | +               | +                 | -              |
| إنتاج غاز H <sub>2</sub> S | *                       | +                      | +                   | -               | -                 | -              |
| حلمأة البوريا              | -                       | -                      | +                   | -               | -                 | -              |
| لايزين ديكر بوكسيلاز       | *                       | +                      | -                   | +               | -                 | +              |
| أرجنين ديهيدرولاز          | +                       | -                      | -                   | -               | +                 | -              |
| أورنثين ديكار بوكسيلاز     | *                       | +                      | +                   | +               | +                 | -              |
| حلمأة الجيلاتين            | +                       | -                      | +                   | -               | -                 | -              |

|  |   |   |   |   |   |                           |
|--|---|---|---|---|---|---------------------------|
| *  | - | - | + | + | + | ONPG                      |
| *  | - | + | - | - | - | فينيل ألانين دياميناز     |
| *  | - | - | - | - | - | تخمير أدونيتول            |
| -  | + | - | + | + | + | تخمير ل - أرابينوز        |
| *  | - | - | - | - | - | تخمير د - أرابيتول        |
| *  | - | - | - | + | - | تخمير سيلوببوز            |
| *  | - | - | - | - | - | تخمير إرثريتول            |
| *  | - | - | - | - | - | تخمير مايو -<br>إينوسيتول |
| -  | + | - | + | + | + | تخمير مالتوز              |
| +  | + | - | + | + | + | تخمير د - مانيتول         |
| *  | + | - | - | + | + | تخمير ل - رامنوز          |
| *  | + | - | - | + | + | تخمير د -<br>سوربيتول     |
| *  | - | - | - | + | + | تخمير سكروز               |
| *  | + | + | + | + | + | تخمير تريهالوز            |
| * لا تجرى هذه الاختبارات عادة لتمييز النوع <i>P. aeruginosa</i> .  |   |   |   |   |   |                           |
| ** الاختبارات الإضافية لتمييز النوع <i>P. aeruginosa</i> : غلوكوز -، إسكولين -، ن-أستيل غلوكوز أمين +، تمثيل حمض كابريك +، بيتا-غالكتوبيرانوزايد -، غلوكونات البوتاسيوم +، تمثيل حمض أدانيك +، تمثيل حمض ماليك +، تمثيل حمض فينيل أستيك +. |   |   |   |   |   |                           |

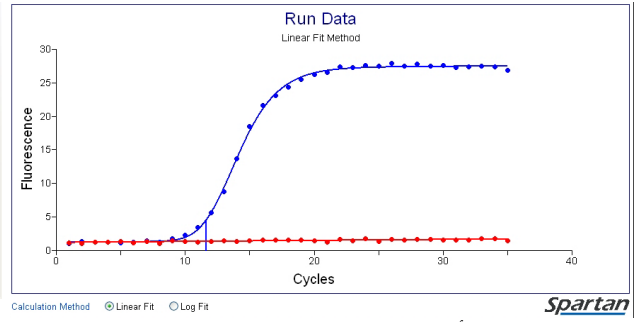
يلاحظ من الجدول 2 أن بكتيريا النوع *P. aeruginosa* تتميز عن بقية الأنواع بكونها موجبة اختبار الأوكسيداز وتستقلب الغلوكوز بطريقة الأكسدة، بينما بقية الأنواع سالبة الأوكسيداز وتستقلب الغلوكوز بطريقة الأكسدة والتخمير معاً. وتتميز بكتيريا النوع *E. coli* عن بقية الأنواع بقدرتها على إنتاج إندول من تريبتوفان، في حين يفرد النوع *E. cloacae* بتفاعل فوغس - بريسكاور الموجب عند مقارنته ببقية أنواع العائلة المعوية الأخرى. بينما يتميز النوع *P. mirabilis* بقدرته على حلماة اليوريا، وقدرته على إنتاج انزيم فينيل ألانين دياميناز، وبعدم قدرته على تخمير سكر د - مانيتول.

## 2- نتائج اختبارات تحديد البكتيريا باستخدام تقانة RT-PCR

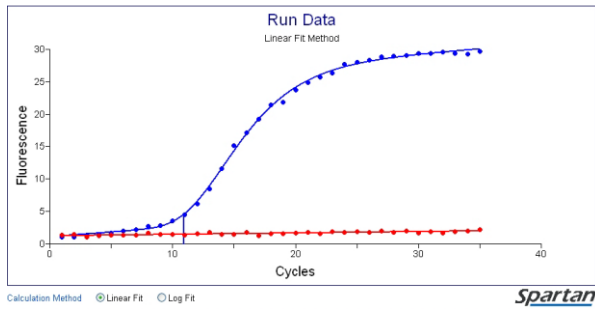
بعد إجراء الاختبارات المورفولوجية والبيوكيميائية التي بينت أن البكتيريا المعزولة من المواد الغذائية المختلفة تنتمي إلى الأنواع الستة السابقة استُخدمت طريقة RT-PCR لتحديد أنواع البكتيريا السابقة بالكشف عن المورثات *uidA*، و *rpoB*، و *ACC-1a*، و *aad*، و *invA* و *regA* للأنواع *E. coli*، و *E. cloacae*، و *H. alvei*، و *P. mirabilis*، و *Salmonella spp.* و *P. aeruginosa* على التوالي وبواقع ثلاثة مكررات، واستُخدم الشاهد السلبي المكون من مزيج SYBR Green Master Mix والمرئسات الأمامي والراجع والماء منزوع الشوارد الخالي من DNase بدون إضافة الـ DNA المستخلص من البكتيريا، بهدف المقارنة بين كفاءة الطريقتين التقليدية و RT-PCR في التشخيص. والشكل 1 يبين منحنيات التآلق لأنواع البكتيريا المدروسة مع قيمة الدورة الحدية (threshold cycle) ( $C_t$ ). كما أُجري اختبار منحنى درجة الانصهار لتحديد قيمة انصهار ( $T_m$ ) الشدقات للتحقق من ارتباط المرئسات بالمورثة المستهدفة (Target gene) من سلسلة الـ DNA والشكل 2 يبين منحنيات درجة الانصهار لأنواع البكتيريا السابقة مع قيمة  $T_m$  لكل منها.



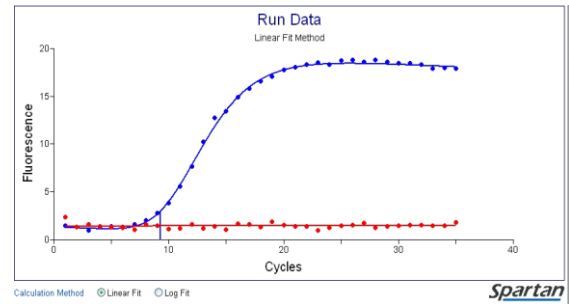
2-1- منحنى التآلق لبكتيريا *E. cloacae* ( $C_t=24.7$ ).



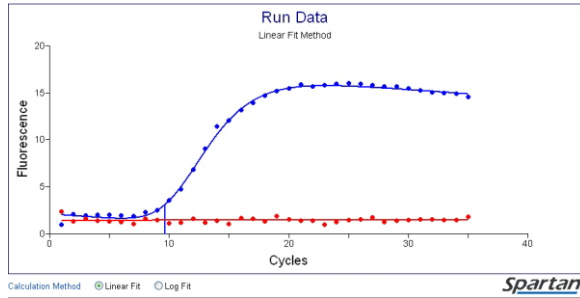
1-1- منحنى التآلق لبكتيريا *E. coli* ( $C_t=11.6$ ).



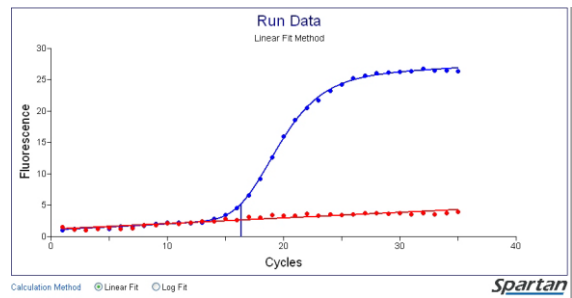
4-1- منحنى التآلق لبكتيريا *P. mirabilis* ( $C_t=10.9$ ).



3-1- منحنى التآلق لبكتيريا *H. alvei* ( $C_t=9.2$ ).



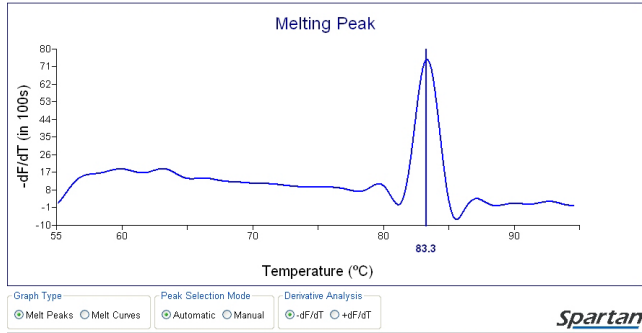
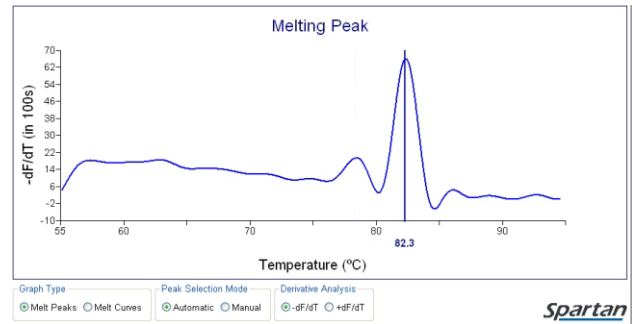
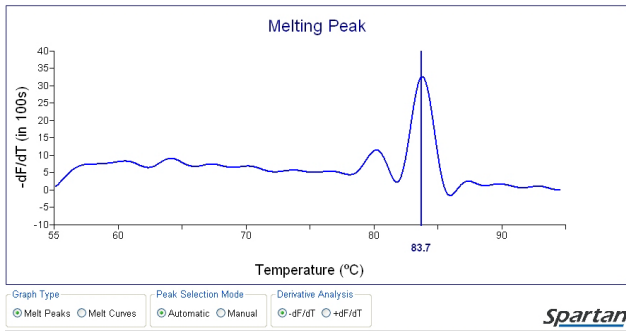
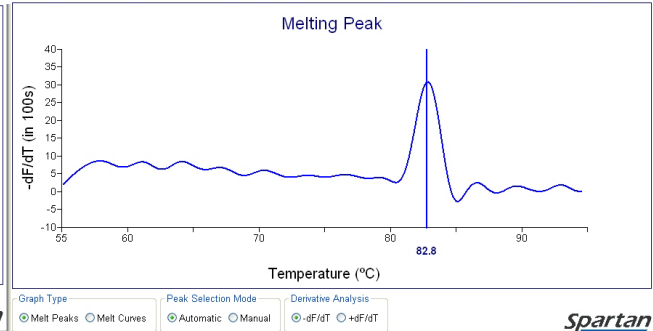
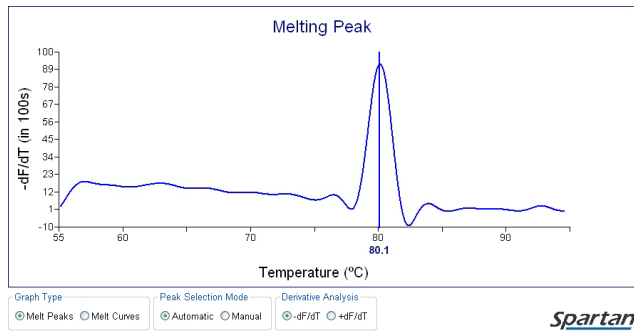
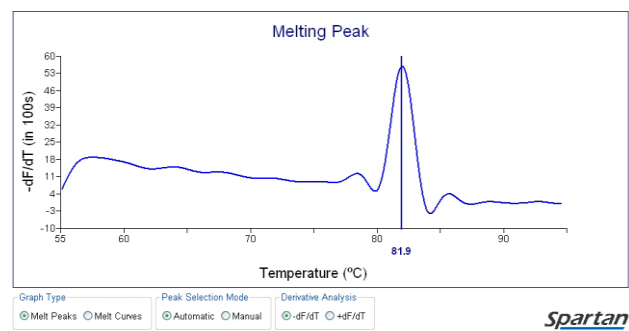
6-1- منحنى التآلق لبكتيريا *P. aeruginosa* ( $C_t=9.6$ )



5-1- منحنى التآلق لبكتيريا *Salmonella spp.* ( $C_t=16.3$ )

الشكل 1. منحنيات التآلق الناتجة عن جهاز RT PCR مع قيمة  $C_t$  لأنواع البكتيريا المدروسة.



2-2- منحنى درجة الانصهار لبكتيريا *E. cloacae* ( $T_m = 83.3^\circ \text{C}$ ).1-2- منحنى درجة الانصهار لبكتيريا *E. coli* ( $T_m = 82.3^\circ \text{C}$ ).4-2- منحنى درجة الانصهار لبكتيريا *P. mirabilis* ( $T_m = 83.7^\circ \text{C}$ ).2-3- منحنى درجة الانصهار لبكتيريا *H. alvei* ( $T_m = 82.8^\circ \text{C}$ ).2-6- منحنى درجة الانصهار لبكتيريا *P. aeruginosa* ( $T_m = 80.1^\circ \text{C}$ ).2-5- منحنى درجة الانصهار لبكتيريا *Salmonella sp.* ( $T_m = 81.9^\circ \text{C}$ ).

## الشكل 2. منحنيات درجة الانصهار الناتجة عن جهاز RT PCR مع قيمة $T_m$ لأنواع البكتيريا المدروسة

يلاحظ من الشكل 1 أن قيمة  $C_t$  تراوحت بين 9.2 و 24.7 في بكتيريا *H. alvei* و *E. cloacae*، بينما بلغت 16.3، و 11.6، و 10.9 و 9.6 في الأنواع *Salmonella sp.*، *E. coli*، *P. mirabilis* و *P. aeruginosa* على التوالي.

وجد Hein وزملاؤه (2006) أن تقانة RT-PCR التي تستهدف المورثة *invA* أعطت نتائجاً إيجابية لسلاسلات *Salmonella sp.* المختبرة كافةً، وبالبلغ عددها 92 سلالة وأن قيمة  $C_t$  كانت 21.9 مما يشير إلى الفعالية المتساوية العزلات المختبرة كافةً، واستنتج أن هذه الطريقة يمكن أن تستخدم كعيار عالمي للكشف عن بكتيريا *Salmonella sp.*

استخدم Anbazhagan وزملاؤه (2011) المورثة *uidA* للكشف عن بكتيريا *E. coli* في العينات الطبية بطريقة تفاعل البوليميراز التسلسلي المتعدد في الزمن الحقيقي (multiplex RT-PCR) باستخدام مرئسات مختلفة عن المرئسات المصممة في هذا البحث ووجد أن درجة انصهار الشدفة الناتجة  $88^\circ \text{C}$ .

وجد أن أعلى قيمة لقمه درجة الانصهار للشدافات الناتجة عن التضخيم كانت في بكتيريا *P. mirabilis* ( $83.7^\circ \text{C}$ ) وأدناها في بكتيريا *P. aeruginosa* ( $80.1^\circ \text{C}$ )، وكانت في بقية الأنواع  $81.9^\circ \text{C}$ ،  $82.3^\circ \text{C}$ ،  $82.8^\circ \text{C}$  و  $83.3^\circ \text{C}$  م بالنسبة لبكتيريا *Salmonella sp.*، *E. coli*، و *H. alvei* و *E. cloacae* على التوالي.

يُلاحظ مما سبق قدرة طريقة RT-PCR على تمييز الأنواع البكتيرية المدروسة كافةً باستخدام المرئسات المصممة في هذا البحث كطريقة سريعة وموثوقة وعالية الدقة ومنخفضة التكلفة نسبياً، بحيث يمكن الاستغناء كلياً عن الطرائق التقليدية.

### الاستنتاجات

- 1- تنتمي أغلب البكتيريا المعزولة من لحوم الدجاج إلى العائلة المعوية (5 أنواع) وهي *E. coli*، و *E. cloacae*، و *H. alvei*، و *P. mirabilis*، و *Salmonella spp.*، بالإضافة إلى نوع واحد لا ينتمي إلى العائلة السابقة وهو *P. aeruginosa*.
- 2- إمكانية تمييز العزلات البكتيرية الممرضة المعزولة من الدجاج بسهولة من خلال المرئسات المصممة في هذه الدراسة والتي كانت مخصصة لتشخيص البكتيريا على مستوى النوع.
- 3- تميزت طريقة RT-PCR بالدقة العالية والسرعة في إظهار النتائج إذ استغرقت فقط ثلاث ساعات مقابل الطرائق التقليدية التي تحتاج إلى عدة أيام، ويوصى باستخدامها في تمييز البكتيريا الممرضة المعزولة من لحوم الدجاج.

### المراجع

- Aarts, H.J.M., R.G. Joosten, M.H.C. Henkens, H. Stegeman and A.H.A.M. van Hoek. 2001. Rapid duplex PCR assay for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. *Journal of Microbiological Methods*. 47(2): 209–217.
- Adékambi, T., M. Drancourt and D. Raoult. 2009. The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends in Microbiology*. 17(1): 37-45.
- Anbazhagan, D., G.G. Kathirvalu, M. Mansor, G.O.S Yan, M.Y. Yusof and S.D. Sekaran. 2010. Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) assays for the detection of *Enterobacteriaceae* in clinical samples. *African Journal of Microbiology Research*. 11: 1186-1191.
- Ben Aissa, M., A.H. Fernea, H. Bouraoui, R. Ben Aissa, P.S. Mercuri and M. Manai. 2011. Molecular characterization of plasmid-encoded ACC-1a4  $\beta$ -lactamase produced by *Salmonella* strains isolated from water in a Tunisian hospital. *Ann Microbiol*. 62(1): 31-36.
- Benamara, H., C. Rihouey, T. Jouenne and S. Alexandre. 2011. Impact of the biofilm mode of growth on the inner membrane phospholipids composition and lipid domains in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1808: 98–105.
- Burall, L.S., J.M. Harro, X. Li, C.V. Lockett, S.D. Himpf, J.R. Hebel, D.E. Johnson and H.L.T. Mobley. 2004. *Proteus mirabilis* genes that contribute to pathogenesis of urinary tract infection: identification of 25 signature-tagged mutants attenuated at least 100-fold. *Infection and Immunity*. 72: 2922-2938.
- Del Cerro, A., S.M. Soto, and M.C. Mendoza. 2003. Virulence and antimicrobial-resistance gene profiles determined by PCR-based procedures for *Salmonella* isolated from samples of animal origin. *Food Microbiology*. 20: 431–438.
- Delmas, J., F. Breyse, G. Devulder, J.-P. Flandrois and M. Chomarat. 2006. Rapid identification of *Enterobacteriaceae* by sequencing DNA gyrase subunit B encoding gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 55: 263–268.
- Dorak M.T. 2010. Real-time PCR. *PubMed Search for Publication*. 10:383–395.

- **Evanylo, L.P., S. Kadis and J.R. Maudsley.** 1984. Siderophore production by *Proteus mirabilis*. *Can. J. Microbiol.* 30: 1046–1051.
- **Feng P. and S.R. Monday.** 2000. Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. *Mol. Cell. Probes.* 14: 333-337.
- **Fenicia, L., F. Anniballi, D. De Medici, E. Delibato and P. Aureli.** 2007. SYBR green real-time PCR method to detect *Clostridium botulinum* type A, *Applied and Environmental Microbiology.* 73(9): 2891–2896.
- **Findlay, J.** 2011. *Klebsiella pneumoniae*: a progression to multidrug resistance. Ph. thesis. University of Edinburgh. p. 89.
- **Fogle, M.R., J.A. Griswold, J.W. Oliver and A.N. Hamood.** 2002. Anti-ETA IgG neutralizes the effects of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *J Surg Res.* 106: 86–98.
- **Frank, D.W.** 1997. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 26: 621–629.
- **Fricker, M., U. Messelhäuser, U. Busch, S. Scherer and M. Ehling-Schulz.** 2007. Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent foodborne outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology.* 73(6): 1892–1898.
- **Fukushima, H., K. Katsube, Y. Tsunomori, R. Kishi, J. Atsuta and Y. Akiba.** 2009. Comprehensive and rapid real-time PCR analysis of 21 foodborne outbreaks. *International Journal of Microbiology:* 1-13.
- **Garrity, G.M.** 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2<sup>nd</sup> Ed., In: Order XIII. "Enterobacteriales". Brenner, D.J. and J.J. Farmer Eds. *Springer:* 587-848.
- **Govan, J.R. and V. Deretic.** 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* 60: 539–574.
- **Hamood, A.N. and B.H. Iglewski.** 1990. Expression of the *Pseudomonas aeruginosa* toxA positive regulatory gene (regA) in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 172: 589–594.
- **Hamood, A.N., J.A. Colmer-Hamood and N.L. Carty.** 2004. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A synthesis. In: J.-L. Ramos Ed. *Pseudomonas: virulence and gene regulation.* *New York Kluwer Academic/Plenum:* 389–423.
- **Hardoim, P.R., R. Nazir, A. Sessitsch, D. Elhottova, E. Korenblum, L.S. van Overbeek and J.D. van Elsas.** 2013. The new species *Enterobacter oryziphilus* sp. nov. and *Enterobacter oryzendophyticus* sp. nov. are key inhabitants of the endosphere of rice. *BMC Microbiology.* 13(164): 1-13.
- **Harrigan, W. F.** 1998. Laboratory methods in food microbiology, 3<sup>ed</sup>. *Academic Press, California, USA:* 164-210.
- **Hein, I., G. Flekna, M. Krassnig and M. Wagner.** 2006. Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. *Journal of Microbiological Methods,* 66: 538–547.
- **Hoorfar, J., P. Ahrens and P. Radstrom.** 2000. Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. *Journal of Clinical Microbiology.* 38(9): 3429–3435.

- **Hyland K.A, L. Kohrt, L. Vulchanova and M.P. Murtaugh.** 2006. Mucosal innate immune response to intragastric infection by *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Molecular Immunology*. 43: 1890–1899.
- **Iglewski, B.H. and D. Kabat.** 1975. NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 72: 2284–2288.
- **Iijima, Y., N.T. Asako, M. Aihara and K. Hayashi.** 2004. Improvement in the detection rate of diarrhoeagenic bacteria in human stool specimens by a rapid real-time PCR assay. *Journal of Medical Microbiology*. 53(7): 617–622.
- **Jain, A.** 2004. Characterization of *Pasteurella multocida* isolates by their outer membrane protein profiles, RAPD patterns and *Tox A* gene detection. Master thesis, Anand Agricultural University. p. 31.
- **Kalland, K.-H.** 2009. Molecular microbial diagnostics. In: Walker, M.J., Raply, R. (ed.). *Molecular biology and biotechnology*. 5<sup>th</sup> Ed. *Royal Society of Chemistry*: 83-111.
- **Khan, A.A., C.D. Melvin and E.B. Dagdag.** 2007. Identification and molecular characterization of *Salmonella* spp. from unpasteurized orange juices and identification of new serotype *Salmonella* strain *S. enterica* serovar Tempe. *Food Microbiology*. 24: 539–543.
- **Kilonzo-Nthenge, A., S.N.Nahashon, F. Chen, and N. Adefope.** 2008. Prevalence and antimicrobial resistance of pathogenic bacteria in chicken and guinea fowl. *Poultry Science*. 87: 1841–1848.
- **Mackay, I.M.** 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 10: 190-212.
- **Massad, G., H. Zhao and H.L.T. Mobley.** 1995. *Proteus mirabilis* amino acid deaminase: cloning, nucleotide sequence, and characterization of *aad*. *Journal of Bacteriology*. 177(20): 5878-5883.
- **Nogva, H.K., A. Bergh, A. Holck and K. Rudi.** 2000. Application of the 5-Nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(9): 4029–4036.
- **Oliveira, C.R.M.T., S. Barbut and M.W. Griffiths.** 2005. Detection of *Campylobacter jejuni* in naturally contaminated chicken skin by melting peak analysis of amplicons in real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 104: 105–111
- **Pollack, M.** 2000. *Pseudomonas aeruginosa*. In: L. Mandell, J. E. Bennett and R.D. Mandell. Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. *Philadelphia, PA: Churchill Livingstone*: 2310–2335.
- **Raivio, T.L., D. Hoffer, R.W. Prince, M.L. Vasil and D.G. Storey.** 1996. Linker insertion scanning of *regA*, an activator of exotoxin A production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*. 22: 239–254.
- **Rossi, F., F. Baquero and P.R. Hsueh.** 2006. In vitro susceptibilities of aerobic and facultatively anaerobic Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: 2004 Results from SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends). *J. Antimicrob. Chemother.* 58(1): 205-210.
- **Sato, H. and D.W. Frank.** 2004. ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol*

*Microbiol.* 53: 1279–1290.

- **Segura, I., J. Casadesús and R.M. Francisco.** 2004. Use of mixed infections to study cell invasion and intracellular proliferation of *Salmonella enterica* in eukaryotic cell cultures. *Journal of Microbiological Methods.* 56: 83– 91.
- **Vasil, M.L., and U.A. Ochsner.** 1999. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol Microbiol.* 34: 399–413.
- **Vliegen I., A.J. Jan, b. Erik, A.B. Kathrien and V. Cornelis.** 2006. Rapid identification of bacteria by real time amplification and sequencing of the 16S rRNA gene. *Journal of microbiological method.* 66: 156-164.
- **Vollenhofer-Schrumpf, S., R. Buresch and M. Schinkinger.** 2007. A simple nucleic acid hybridization/latex agglutination assay for the rapid detection of polymerase chain reaction amplicons. *Journal of Microbiological Methods.* 68: 568–576.
- **Woods, D.E. and M.L. Vasil.** 1994. Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. In: A.L. Baltch and R.P. Smith Eds. *Pseudomonas aeruginosa: infections and treatment, New York: Marcel Dekker:* 21–50.
- **Ye, Y., J.B. Li, and D.Q. Ye.** 2006. *Enterobacter* bacteremia: clinical features, risk factors for multiresistance and mortality in a Chinese University Hospital. *Infection.* 34(5): 252-257.
- **Zhang, H., Z-Q. Gao, X-D. Su and Y-H. Dong.** 2012. Crystal structure of type VI effector Tse1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Letters.* 586: 3193–3199.

**N° Ref: 553**