



جامعة الموصل
كلية الطب البيطري

الكشف الجزيئي عن بعض جينات الضراوة لجراثيم الزوائف الزنجارية المعزولة من أسماك الكارب الشائع في مدينة الموصل

أسماء جواد خليل الطائي

رسالة ماجستير
الطب البيطري / الأحياء المجهرية البيطرية

بإشراف
الاستاذ
سمية ياسين عبد الله الدباغ

الخلاصة

تتعرض الأسماك للعديد من مسببات الأمراض بما في ذلك المسببات الجرثومية وذلك تبعاً لطبيعة بيئتها. لذلك هدفت الدراسة الحالية إلى عزل وتوصيف جراثيم الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* مظهرياً وجزئياً، من عينات أسماك الكارب الشائع (*Cyprinus carpio*) الطازجة المأخوذة من أسواق الأسماك المحلية وأحواض الأسماك في مدينة الموصل. وتحديد نسبة انتشارها، والتعرف على حساسيتها للمضادات الحيوية. وتحديد بعض جينات الضراوة لعزلات الزوائف الزنجارية، علاوة على إجراء تحليل التتابع الجيني DNA Sequencing لمعرفة النشوء التطوري لهذه الجراثيم.

تم جمع ٧٥ عينة سمكية من مواقع مختلفة من أسواق مدينة الموصل (سوق النبي يونس والميدان) و (٧٥) عينة سمكية من المزارع السمكية (منطقة الكبة، الرشيدية، يارمجة، وحاوي الكنيسة) خلال الفترة (أيلول ٢٠٢١ – كانون الثاني ٢٠٢٢). وتم وضع كل عينة بصورة منفصلة في أكياس بلاستيكية معقمة ونقلها مباشرة إلى مختبر الأحياء المجهرية بكلية الطب البيطري تحت ظروف التبريد. تم أخذ مسحات من (الخيائشيم والجلد والأمعاء والعضلات) لكل عينة من عينات الأسماك.

بلغ معدل عزل الزوائف الزنجارية (٢٦.٦٦%، ٢٠%) للأسماك المسوقة وأسماك الأحواض على التوالي، والتي تم تأكيدها من خلال الاختبارات المايكروبيولوجية التقليدية (الشكل والاختبارات الكيموحيوية) والتعريف الجزيئي. شكلت عزلات جراثيم الزوائف الزنجارية (٤٢.٥، ٣٧.٥، ١٥، ٥) % لكل من عينات الخياشيم والجلد والأمعاء والعضلات على التوالي للأسماك المأخوذة من الأسواق. وشكلت (٣٦.٦، ٣٠، ٢٥، ٨.٣) % لكل من عينات الجلد والخيائشيم والأمعاء والعضلات على التوالي لأسماك الأحواض. بينت نتائج الكشف الجزيئي لعزلات الزوائف الزنجارية امتلاكها للجينين (*rpoB* و *16SrDNA*) بنسبة (١٠٠%)، وجينات الفوعة *oprL* و *ToxA* و *algD*، والتي تعبر عن البروتين الدهني للغشاء الخارجي، والسموم الخارجية *A*، والألجينات على التوالي، وشكل الجين *oprL* (٩٧.٥%، ١٠٠%) في كل من الأسماك المسوقة وأسماك الأحواض، في حين كل من جين *ToxA* وجين *algD* نسبة (١٠٠%) في كلتا المجموعتين من الأسماك.

أظهرت نتائج فحص الحساسية للمضادات الحيوية مقاومة عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من كلتا المجموعتين من الأسماك لكل من المضادين الحيويين الاموكسيسيلين ($10 \mu g$ AM) والتتراسايكلين

(ب)

(TE 10 µg) بنسبة (١٠٠%). أبدت الزوائف الزنجارية المعزولة من عينات أسماك الأحواض مقاومة عالية لكل من المضادين الحيويين السيفاتراكون والسيفوتاكسيم وبنسبة (٩٠% و ٨٤%) مقارنة مع النسبة (٣٦% و ٥٠%) لنفس المضادين للزوائف الزنجارية المعزولة من عينات أسماك الأسواق المحلية. فيما إتصفت عزلات الزوائف الزنجارية بحساسيتها لكل من المضادين الحيويين السيبروفلوكساسين (CIP 10 µg) والليفوكساسين (LEV ٥ µg) ، والأميكاسين (AK 30 µg) وبالنسب المئوية (٨٨% و ٨٢% و ٧٤%) على التوالي من عينات أسماك الأسواق المحلية، وبالنسب المئوية (٨٠% و ٧٤% و ٦٤%) على التوالي للزوائف المعزولة من عينات أسماك الأحواض. فيما تبينت في حساسيتها لكل من المضادات الحيوية الأخرى والتي شملت كل من التوبراميسين (T.B 10 µg) والجنتاميسين (CN 10 µg). وسُجلت سلالتين من الزوائف الزنجارية التي تأوي كل من جيني الضراوة algD و toxA في البنك العالمي الأمريكي للجينات NCBI بالمسميين 22-AS-algD و 22-AS-TOX-A تحت الرقم التسلسلي للنيوكليوتيدات (ON 993771) (والرقم (ON 9937271) على التوالي ، ومن ثم تحديد درجة القرابة بين السلالات باستخدام الشجرة الوراثية. أظهرت الجينات درجة قرابة عالية جدا تراوحت ما بين (٩٨.٦-٩٩.٩%) مع السلالات العالمية . استنتجت هذه الدراسة ارتفاع معدل عزل جراثيم الزوائف الزنجارية والتي تمتلك عوامل ضراوة متعددة في عينات الأسماك بمدينة الموصل. وتبين أن الجينين rpoB و SrDNA ١٦ هما جينين أساسيين في الكشف الجزيئي عن هوية جراثيم الزوائف الزنجارية والتي تمتلك جينات الضراوة oprL و algD و ToxA ، لذلك قد تسبب أمراضًا خطيرة في أسماك الكارب الشائع (*Cyprinus carpio*) ، وبالتالي تسبب خسائر اقتصادية ، علاوة على تأثيرها على صحة المستهلك. كما لوحظت مقاومة الزوائف الزنجارية للعديد من المضادات الحيوية، فيما كانت المضادات الحيوية السبروكساسين والليفوكساسين والأميكاسين الأكثر فاعلية ضد جراثيم الزوائف الزنجارية المعزولة من عينات الأسماك.



University of Mosul
College of Veterinary Medicine

**Molecular detection of some virulence genes
of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from
common carp (*Cyprinus carpio*)
in Mosul city**

Asmaa Jead Khalil Altaee

M.Sc / Thesis

Veterinary Medicine / Veterinary Microbiology

Supervised by professor

Sumaya Yaseen Abdulla Al-Dabbagh

٢٠٢٢ A.D

١٤٤٤ A.H

Abstract

Depending on the nature of the fish's environment, they are susceptible to many pathogens, including bacterial causes, so the goals of the current study are isolation and morphological and molecular identification of *Pseudomonas aeruginosa* with its prevalence rate and detected some of virulence genes from fresh fish (*Cyprinus carpio*) samples were taken from local fish's markets and farms in Mosul city. And identify their sensitivity to antibiotics. in addition to using DNA sequencing analysis to determine the evolutionary relationship of this bacterium.

A total of ٧٥ fish sample were collected from variable localities from Mosul city markets and (٧٥) fishes sample from fish farms, during the period between (September ٢٠٢١ to January ٢٠٢٢). Each sample was placed separately in sterile plastic bags and was transferred directly to the microbiology laboratory, College of Veterinary Medicine, under cooling conditions. The swabs were taken from the (gills, skin, intestine and muscles) of fish's sample.

The prevalence rate of *P. aeruginosa* were reached (٢٦.٦٦%, ٢٠%) for marketed and farms fishes respectively, which were confirmed by traditional microbiological tests (cultural phenotypically, microscopically features and API٢٠-NE test) and molecular identification. The *P. aeruginosa* isolates formed (٤٢.٥%, ٣٧.٥%, ١٥%, ٥%) from gills, skin, intestines and muscles respectively from marketed fishes, while formed (٣٦.٦%, ٣٠%, ٢٥%, ٨.٣%) from the skin, gills, intestines and muscles, respectively from fish farms. The molecular detection results showed all *P. aeruginosa* isolates have rpoB gene and ١٦SrDNA (١٠٠%). And

virulence genes *oprL*, *toxA*, and *algD*, which express the outer membrane lipoprotein, exotoxin A and alginate respectively, formed (97.5%) for the *oprL* gene and (100%) of both *toxA* and *algD* genes in marketed fish, and formed (100%) for all previous genes in fish farms.

The results of the antibiotic susceptibility test showed that *Pseudomonas aeruginosa* isolates from both groups of fish samples were resistant (100%) to both antibiotics amoxicillin (AM 10 µg) and tetracycline (TE 10 µg). Isolates of *P. aeruginosa* from fish farms samples showed high resistance to both antibiotics ceftriaxone and cefotaxime (90% and 84%) respectively while the resistance percentage (36% and 50%) for isolates from local marketed fish samples for the same antibiotics. While *P. aeruginosa* isolates were sensitive to the antibiotics, ciprofloxacin (CIP 10 µg) and levofloxacin (LEV 5 µg) and amikacin (AK 30 µg) at percentage (88%, 82%, 96%) respectively, for isolates from local market fish samples, and (80%, 94%, 94%), respectively, for isolates from fish farms samples. *P. aeruginosa* isolates varied in their sensitivity to each of the other antibiotics, which included tobramycin (T.B 10 µg), gentamicin (CN 10 µg). The study showed that *P. aeruginosa* isolates gave positive results for each hemolytic activity, protease, lecithinase and lipase virulence factors tests. DNA sequencing of some *Pseudomonas aeruginosa* isolates has been determined. Two isolates of *P. aeruginosa* that harboured *algD* and *toxA* genes were recorded in the American World Gene Bank NCBI, at the names ,*algD* - AS-22 and TOX-A-AS-22 under the accession numbers of nucleotide sequence, (ON993771) and (ON937271) respectively, then determine the degree of kinship between the isolates using the phylogenetic tree. This study concluded that *P. aeruginosa* bacteria which have multiple virulence factors ,were highly prevalent in fish samples in Mosul city.

The two genes *rpoB* and *16SrDNA* are essential genes in the molecular identification of *P. aeruginosa*. which was found to have *oprL*, *algD* and *ToxA* virulence genes, so it may cause serious diseases in fish (*Cyprinus carpio*), and thus cause economic losses, in addition to its impact on consumer health. It was also observed that resistance of *P. aeruginosa* to many antibiotics, while the antibiotics ciprofloxacin , ceftriaxone and amikacin (AK³, μg) were the most effective against *P. aeruginosa* isolated from fish samples.