Ministry of Higher Education and

Scientific Research

University of Mosul

College of Science

Depart. of Biology

Genetic Characterization of Virulence Factors from *Enterococcus spp*. Isolated from some Swimming Pools and Recreation Areas in Tigris River

Reyam Hasan AbdAlrazzaq Hasan

M.Sc. Thesis

In

Biology / Microbiology

Supervised By

Assistant Professor

Dr. Rayan Mazin Faisal

1443 A.H. **2022 A.D.**

Abstract

Ten water samples were collected from swimming pools and recreation areas from Tigris river in Mosul city during the period of November 2020 to March 2021. Water samples were filtered and spread on the chromogenic Hicrome *Enterococcus faecium* agar in an attempt to isolate *Enterococcus spp.* According to the characteristics of the colonies obtained as indicated by Himedia, three out of ten water samples (30%) showed the presence of *Enterococcus* isolates by producing either blue or green colored colonies. From the three samples containing enterococcus, 47.9% colonies were identified as *Enterococcus* while 52.1% were non- enterococci colonies producing different colors for colonies that were not mentioned by Himedia. Thirteen colonies of different colors were selected and identifiied by VITEK-2 system and 16S rRNA gene sequencing. Results indicated major differences between the two methods for identification with the 16S rRNA sequencing being more efficient. Our results proved that some blue or green colonies belonged to different genera other than *Enterococcus* such as *Aerococcus*, *Aeromonas*, *Cellvibrio*, and *Paenibacillus*. All isolates identified in this study was submitted to genbank (NCBI) and were provided with specific accession numbers.

Interestingly, diagnosis of the orange colony by 16S rRNA sequencing showed that this colony belonged to *Enterococcus casseliflavus.* The detection of orange colonies that were diagnosed as *Enterococcus* is considered a false negative result when isolating *Enterococcus* using Hicrome *Enterococcus faecium* agar media, as such colony turned out to belong to the genus *Enterococcus*. According to our results, we prove for the first time that orange colonies that appear on Hicrome *Enterococcus faecium* agar media should not be ignored when searching for *Enterococcus spp.* strains.

Antibiotic resistance of the environmentally isolated bacteria from water samples were tested for the resistance to 8 antibiotics. Results revealed the

threat of antibiotic resistance spread among environmental bacteria as 64.2% were resistant to streptomycin, 50% resistant to gentamycin, ciprofloxacin, kanamycin, 42.8% resistant to ampicilin, vancomycin, tetracycline and 35.7% resistant to chloramphenicol. Antibiotic resistance for *Enterococcus* isolates from water showed that they were 100% resistant to gentamycin, 66.6% resistant to streptomycin, ciprofloxacin and kanamycin, and 33.3% resistant to ampicillin, tetracycline, and chloramphenicol, while none of the isolates were resistant to vancomycin.

The incidence of nine virulence genes (*gelE*, *efaAfs*, *ace*, *agg* , *esp*, *cylA*, *asa1*, *eep*, and *hyl*) in *Enterococcus spp*. isolated from water and three pathogenic *Enterococcus faecalis* isolates were studied to identify the spread of virulence genes in environmental isolates compared to pathogenic enterococci. The percentages for the virulence genes in environmental enterococci were as follow: *gelE* (66.6%), *ace* (66.6%), *efaAfs* (66.6%) and *agg* (33.3%). while none of the isolates carried *esp, asa1, hyl, cylA,* or *eep*. The results indicates the occurrence of virulence genes at higher ratios in pathogenic compared to environmentally isolated enterococci, however, such ratios are still high and can lead to serious infections.

Conjugation experiments showed the possibility of antibiotic resistance genes to transfer via horizontal gene transfer between pathogenic enterococci. Analysis of transconjugant cells for their acquisition of *eep* indicated that this virulence gene is more likely chromosomally located as it was incapable of transferring to transconjugants. However, our results showed that chloramphenicol resistance is carried on self-transmissible plasmids that can be transferred between enterococci species and lead to the spread of antibiotic resistance.

الخلاصة

تم جمع عشر عينات مياه من حمامات السباحة ومناطق الاستجمام من نهر دجلة في مدينة الموصل خلال الفترة من تشرين الثاني ٢٠٢٠ إلى آذار ٢٠٢١. تمت تصفية عينات المياه ونشرها على وسط Hicrome *Enterococcus faecium* agar في محاولة لعزل بكتريا المكورات المعوية. اعتمادا عن خصائص المستعمرات التي تم ذكرها بواسطة Himedia ، أظهرت ثلاث عينات (٣٠٪) من أصل عشرة من عينات المياه وجود عزلات لبكتريا المكورات المعوية عن طريق إنتاج مستعمرات ملونة بلون ازرق او اخضر . من العينات الثلاثة المحتوية على المكورات المعوية ، تم تحديد ٤٧,٩٪ مستعمرة على أنها مستعمرات معوية بينما ٥٢,١٪ كانت مستعمرات غير معوية تنتج ألوانًا مختلفة للمستعمرات التي لم يتم ذكرها بواسطة Himedia, تم اختيار ثلاثة عشر مستعمرة من ألوان مختلفة وتحديدها بواسطة نظام VITEK-2 وتسلسل المورث 16S rRNA أشارت النتائج إلى وجود اختلافات كبيرة بين الطريقتين حيث وجد ان استخدام تسلسل الرنا الريباسي أكثر كفاءة. وكذلك وجد أن بعض المستعمرات الزرقاء أو الخضراء تنتمي إلى أجناس مختلفة غير المكورات المعوية مثل *Aerococcus* و *Aeromonas* و *Cellvibrio* و *Paenibacillus* جميع العزلات المعزولة قيد الدراسة تم تسجيلها في بنك الجينات الواقع ضمن NCBI وتم منح كل عزلة رقم تعريفي عالمي خاص بها.

من المثير للاهتمام، أن تشخيص المستعمرة البرتقالية بواسطة 16SrRNAأظهر أن هذه المستعمرة تنتمي إلى *E. casseliflavus*. يعتبر اكتشاف المستعمرات البرتقالية التي تم تشخيصها بانها مكورات المعوية نتيجة سلبية خاطئة عما ذكر عن عزل *Enterococcus* باستخدام Hicrome *Enterococcus faecium* agar media حيث تبين أن هذه المستعمرة تنتمي إلى جنس *Enterococcus*. وفقًا لنتائجنا ، أثبتنا لأول مرة أنه لا ينبغي تجاهل المستعمرات البرتقالية التي تظهر على وسائط Hichrome *Enterococcus faecium* agar عند البحث عن سلالات *Enterococcus spp*.

تم اختبار مقاومة المضادات الحيوية للبكتيريا المعزولة بيئيًا من عينات المياه لمعرفة مقاومتها لـ ٨ مضادات حيوية. كشفت النتائج عن خطر انتشار مقاومة المضادات الحيوية بين البكتيريا البيئية حيث أنها مقاومة streptomycin بنسبة ٦٤,٢٪ ، ومقاومة بنسبة ٥٠٪ لكل من Gentamycin و Ciprofloxacin وKanamycin ومقاومة بنسبة ٤٢,٨٪ لكل من Ampicilin وVancomycin و Tetracyclinومقاومة بنسبة ٣٥,٧٪ لل Chloramphenicol .

أظهرت مقاومة المضادات الحيوية لعزلات المكورات المعوية من الماء على أنها مقاومة لل Gentamycin بنسبة ١٠٠٪ ونسبة ٦٦,٦٪ لكل من مقاومة Streptomycin و Ciprofloxacin و

Kanamycin , وبنسبة ٣٣,٣٪ لكل من Ampicilin و Tetracyclineو Chloramphenicol , بينما لم تكن أي من العزلات مقاومة Vancomycin.

حدوث تسعة جينات فوعة في *Enterococcus spp.* وهي (*gelE* و *efaAfs* و *ace* و *agg* و *esp* و *cylA* و *asa1* و *eep* و *hyl*). تم عزل *Enterococcus* من عينات الماء بالاضافة الى ثلاث عزلات ممرضة من *Enterococcus faecalis* لاجل التعرف على انتشار جينات الفوعة في العزلات البيئية مقارنة بالعزلات الممرضة من *Enterococcus* . كانت النسبة المئوية للجينات الفوعة في المكورات المعوية البيئية كما يلي: gelE (66.6%) و ace(٦٦,٦%) و efaAfs (٦٦,٦%) وagg (٣٣,٣%) بينما لم تحمل أي من العزلات على جينات الفوعة *esp* أو *asa1* أو *hyl* أو *cylA* أو *eep*. تشير نتائجنا إلى حدوث جينات الفوعة بنسب أعلى في المكورات المعوية الممرضة مقارنة بالمكورات المعوية المعزولة بيئيًا ، ومع ذلك ، لا تزال هذه النسب مرتفعة ويمكن أن تؤدي إلى التهابات خطيرة.

أظهرت تجارب الاقتران إمكانية انتقال الجينات المقاومة للمضادات الحيوية عبر نقل الجينات الأفقي بين المكورات المعوية المسببة للأمراض. أشار تحليل الخلايا المتحولة من أجل اكتسابها لـ eep إلى أن هذا الجين الضار يكون على الأرجح موجودًا في الكروموسومات لأنه غير قادر على الانتقال إلى المتحولين. ومع ذلك ، أظهرت نتائجنا أن مقاومة الكلورامفينيكول تتم على البلازميدات ذاتية الانتقال والتي يمكن أن تنتقل بين أنواع المكورات المعوية وتؤدي إلى انتشار مقاومة المضادات الحيوية.

وزارة التعليم العالي والبحث العملي
جامعة الموصل
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

التوصيف الجيني لعوامل الضراوة في بكتريا المكورات المعوية المعزولة من بعض احواض السباحة ومناطق السباحة في نهر دجلة

ريام حسن عبدالرزاق حسن

رسالة ماجستير

علوم الحياة / الأحياء المجهرية

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور ريان مازن فيصل

١٤٤٣هـ **٢٠٢٢ م**