جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الموصل / كلية العلوم

دراسة بكتريولوجية وجزيئية لبكتريا *Pseudomonas* spp. المعزولة من مصادر سريرية مختلفة

فادية محمد محمود علي الحديدي

رسالة ماجستير

علوم الحياة / احياء مجهرية

بإشراف

المدرس الدكتورة

سحر سالم بطرس داود النقار

1446هـ

2025 م

الخلاصة

تضمنت الدراسة جمع 190 عينة سريرية من المرضى الراقدين والمراجعين الى مستشفى السلام ومستشفى الموصل العام ومستشفى ابن سينا التعليمي ومستشفى الحروق، للفترة من 1/10/2023 ولغاية 1/3/2024، ومن كلا الجنسين وللاعمار من (1–70) سنة. شملت 82 عينة من الإدرار، 63 مسحة من الحروق، 14 عينة من الدم، 11 عينة من سائل النخاع الشوكي ، 8 عينات من القشع، 4 مسحات من الجروح، 4 عينات من غسيل القصبات الهوائية، ، وعينة واحدة السائل الزليلي ، ومسحة واحدة من كل من الاذن واللوزتين والمهبل.

بالاعتماد على نتيجة الزرع وشكل المستعمرات النامية على وسطي اكار الماكونكي واكار الدم، والفحص المجهري للخلايا المصبوغة بصبغة كرام، والفحوصات الكيموحيوية، ونتائج التشخيص بنظام APIE20، تم الحصول على 36 (21.7%) عزلة من *Pseudomonas* spp. من أصل 166 عينة أعطت نمواً موجباً. منها 33 (19.9%) عزلة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ، تم تسجيل 6 عزلات في المركز الوطني لمعلومات التقانات الحيوية National Center for Biotechnology Information (NCBI). كما تم تأكيد تشخيص 3 عزلات باستخدام تحليل 16S rRNA وهي FS-3iq *Pseudomonas fluorescens* و FS-8iq *Pseudomonas oryzihabitans* و FS-9iq *Pseudomonas vancouverensis* وبنسبة (0.6%) لكل منها ،والأخيرة سُجلت لأول مرة محلياً.

وأظهرت نتائج اختبار حساسية 13 نوعا من المضادات الحيوية لبكتريا *P. aeruginosa* أن أعلى نسبة مقاومة كانت تجاه Cefotaxime و Cefixime وبلغت (100%)، واقل نسبة مقاومة كانت للمضادين الحيويين Imipenem و Aztreonam اذ بلغت (66.7%). وقد اظهرت 19 (57.6%) منهامقاومة كاملة للمضادات الحيوية Pan Drug Resistant (PDR) و6 (18.2%) مقاومة شديدة للمضادات الحيوية Extensive Drug Resistant (XDR) و 8 (24.2%) مقاومة متعددة للمضادات الحيوية Multidrug Resistant Bacteria (MDR) .

وأظهرت العزلة FS-3iq *P. fluorescens* مقاومة لكل من مضادات Cephalosporins و Fluoroquinolones وكانت من النوع MDR. أما العزلة FS-8iq *P. oryzihabitans* فكانت

مقاومة لكافة أنواع المضادات الحيوية وهي من النوعPDR ، والعزلة *P. vancouverensis* FS-9iq أظهرت حساسية فقط لكل من Imipenem و Meropenem وهي من النوع XDR.

تم الكشف عن قدرة العزلات على تكوين الأغشية الحيوية، اظهرت 4 عزلات فقط من *P. aeruginosa* وعزلة *P. fluorescens* FS-3iq قدرة على تكوين الأغشية الحيوية باستخدام وسط آكار الكونغو الأحمر، أما عند استخدام طريقة الصفيحة المعيارية فأظهرت كل العزلات قيد الدراسة قدرة على تكوين الأغشية الحيوية بنسب متفاوتة.

تم التحري عن وجود بعض الجينات في العزلات التسعة المسجلة في NCBI،وهي :

gene (*opr L/ opr I*): يشفر هذان الجينان البروتينات الدهنية lipoprotein .

gene *exo A* : يشفر هذا الجين افراز الذيفانات الخارجية وهو من عوامل الضراوة في البكتريا .

gene *par E*: هذا الجين مشفر لانزيم تضاعف DNA مثل Topoisomerase ويعمل على مقاومة مضادات الفلوروكينولونات .

gene *mex A*: هو جزء من نظام مضخة التدفق ويعمل على مقاومة مضادات البيتالاكتام .

gene (*S1S2 imm/ S3 RB*) : جينات مشفرة لانتاج البايوسينات .

las R gene: من الجينات المهمة التي لها دور في ظاهرة استشعار النصاب .

بالنسبة لبكتريا *P. aeruginosa* بلغت نسبة الوجود (100%) للجينات *opr L* و *mex A* و *S1S2 imm* و *Las R* ونسبة (83.3%) لكل من *exoA* و *parE* و *S3RB* ؛ اما كل من *P.fluorescens*FS-3iq و *P. oryzihabitans* FS-8iq و *P. vancouverensis* FS-9iq ضمت الجينات المشار اليها اعلاه باستثناء*S3*RB لم يظهر في العزلتين *P.oryzihabitans* FS-8iq و *P. vancouverensis* FS-9iq. فضلاً عن ان العزلات التسعة لم تحتوي على جين الضراوة *oprI*.

لمعرفة العلاقة التطورية لعزلات *Pseudomonas* spp. بالاعتماد على الجين 16S rRNA، أستُعملت طريقة Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean UPGMA، والمتضمن البرنامج Molecular Evolutionary Genetics Analysis Mega 10.0 ، ومنه تبين ان عزلات بكتريا *P. aeruginosa* المسجلة في NCBI اظهرت ارتباطا مع بعضها، مما يشير الى وجود صفات مشتركة فيما بينها بالرغم من عزلها من مصادر سريرية مختلفة. في حين ابتعدت العزلتين *P.fluorescence* FS-3iq و *P. vancoverensis* FS-9iq عن العينة. فيما لم يتم ادخال *P. oryzihabitan*s FS-8iq ضمن الشجرة لكون تتابعاتها قصيرة.

Abstract:

The present study included (190) clinical specimen collected from oupatients and inpatients attending Al-Salam, Mosul general, Ibn-Sina and Burn Hospitals during the period between October 1, 2023, and March 1, 2024. from both sexes and ages from (1-70) years. These specimens consisted of (82) urine samples, (63) burn swabs, (14) blood samples, 11 cerebrospinal fluid samples, (8) sputum samples, (4) wound swabs, (4) bronchial lavages , one sample of each of Synovial fluid , ear swabs, tonsil swabs, and vaginal swab.

Based on cultural characteristics , colony morphology on MacConkey and blood agar , microscopic observation of gram staining, biochemical tests, and APIE20 diagnostic results , (36) *Pseudomonas* spp. (21.7%) were obtained out of 166 positive cultures. Among these (33) (19.9%) were *Pseudomonas aeruginosa.* Six isolates were registered in National Center for Biotechnology Information (NCBI). Furthermore; (3) pseudomonas isolates were confirmed using 16SrRNA analysis and were *Pseudomonas fluorescens* FS-3iq , *Pseudomonas oryzihabitans FS-8iq* and *Pseudomonas vancouverensis* (0.6%) for each, and the latter was registered for the first time locally..

Antibiotic sensitivity using (13) antibiotics against *P. aeruginosa* revealed the highest resistance for each (100%) of Cefotaxime and Cefixime while the lowest resistance (66.7%) was of Aztreonam and Imipenem . Also, (19) (57.6%) of *P. aeruginosa* isolates were Pan Drug Resistant (PDR), (6) (18.2%) were Extensive Drug Resistant (XDR). And finally, (8) (24.2%) were Multi Drug Resistant (MDR).

The MDR isolate *P. fluorescens FS-3iq* demonstrated resistance to each of Cephalosporins and Fluoroquinolones , while PDR *P. oryzihabitans FS-8iq* showed resistance to all antibiotics used, and lastly, the XDR *P. vancouverensis FS-9iq* was only resistant to Imipenem and Meropenem .

The ability of Biofilm formation was also evaluated to show that only (4) *P. aeruginosa* isolates and (1) *P. fluorescens* were capable of biofilm formation using Congo Agar. On the other hand , all isolates formed biofilm at various amounts by using Microtiter Plate Method.

The presence of some genes in the nine isolates registered in NCBI was investigated, which are:

opr L/opr I gene: These two genes encode lipoprotein.

exo A gene: This gene encodes the secretion of exotoxins and is one of the virulence factors in bacteria.

par E gene: This gene encodes a DNA replication enzyme such as Topoisomerase and works to resist fluoroquinolone antibiotics.

mex A gene: It is part of the efflux pump system and works to resist beta-lactam antibiotics.

S1S2 imm/ S3 RB gene : Genes encoded for the production of pyocins.

las R gene: One of the important genes that play a role in the phenomenon of quorum sensing.

For *P. aeruginosa* bacteria, the presence rate reached (100%) for the genes *opr L, mex A, S1S2 imm*, and *Las R*, and (83.3%) for each of *exoA, parE*, and *S3RB*; as for each of *P. fluorescens*FS-3iq and *P. oryzihabitans* FS-8iq and *P. vancouverensis* FS-9iq contained the above-mentioned genes except *S3RB* which did not appear in the two isolates *P. oryzihabitans* FS-8iq and FS-9iq *P. vancouverensis*. In addition, the nine isolates did not contain the virulence gene *oprI.*

The isolates *P. fluorescens FS-3iq , P. oryzihabitans FS-8iq and P. vancouverensis FS*-9iq also demonstrated the presence of the genes above except *S3RB* which was absent in *P. oryzihabitans FS-8iq and P. vancouverensis FS*-9iq . All nine isolates showed the absence of *oprI* virulence factor.

To determine the evolutionary relationship of *Pseudomonas* spp. isolates based on the 16S rRNA gene, the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean UPGMA was used, including the Molecular Evolutionary Genetics Analysis Mega 10.0 program, and it was found that the isolates of *P. aeruginosa* bacteria registered in NCBI showed a relationship with each other, indicating the presence of common characteristics between them despite their isolation from different clinical sources. While the two isolates *P.fluorescence* FS-3iq and

P. vancoverensis FS-9iq were far from the sample . *P. oryzihabitans* FS-8iq was not included in the tree because its sequences were too short.

The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
University of Mosul / College of Science
Department of biology

Bacteriological and Molecular Study of *Pseudomonas* spp. Isolated from Different Clinical Sources

Fadya Mohammed Mahmmod Ali Al-Hadidy

M.Sc. thesis

Biology / Microbiology

Supervised by

Dr. Sahar Salim Petrus Dawood ALnaqaar

2025 A.D. **1446 A.H**