جامعــة الموصــل

كليــة الطب البيطري

مدى انتشار جراثيم السالمونيلا المنتجة للبيتالاكتاميز في الحمام المحلي في محافظة نينوى

محمد جاسم محمد عويد

رسالة ماجستير

الطب البيطري/ الصحة العامة البيطرية

بإشراف

الاستاذ الدكتور

عقيل محمد شريف خضر

1444هـ

2022م

الخلاصة

أُجريت هذه الدراسة عن مدى إصابة الحمام غير البالغ والحمام البالغ وبيئة تربيتهُما من معالف ومناهل وفرشة وأيدي المربين بجراثيم السالمونيلا لـ 34 منطقة موزعة في محافظة نينوى. إذ تم أخذ 400 مسحة للأعضاء الداخلية من الحمام غير البالغ والحمام البالغ، وزعت على الشكل التالي: 195 مسحة للحمام غير البالغ (بعمر أقل من 6 أشهر) شملت 50 مسحة أمعاء و50 مسحة أكباد و35 مسحة من فتحة المجمع و35 مسحة قلب و 20 مسحة طحال و5 مسحات بنكرياس ، وكذلك 205 مسحة للحمام البالغ (أكثر من 6 أشهر) شملت 50 مسحة أمعاء و50 مسحة أكباد و40 مسحة من فتحة المجمع و40 مسحة قلب و 20 مسحة طحال و5 مسحات بنكرياس.

أما مسحات بيئة تربية الحمام فقد شملت 50 مسحة من الفرشة و50 مسحة من المعالف و45 مسحة من المناهل(مياه الشرب) و 5 مسحات لغسول أيدي المربين .أسُتخدمت مختلف الأوساط الناقلة والأغنائية والانتخابية في عزل جراثيم السالمونيلا وتم التاكد منها باستخدام الصبغات والفحوصات الكيموحيوية الخاصه بها. ولأختبار الحساسية أخُضعت 30 مسحة من جراثيم السالمونيلا المعزولة لـ 16 نوع من انواع المضادات الحيوية. تم فحص قابلية 16 من عزلات جراثيم السالمونيلا في انتاجها لانزيم البيتا لاكتاميز بأستخدام المضادات الحاوية على حلقة البيتا لاكتام.

كما وجُمعت ومن الطيور ذاتها 23 عينة دم من الحمام غير البالغ و 69 عينة من الحمام البالغ لقياس مستوى أضداد جراثيم الـ *Salmonella enteritides* باستخدام طريقة الادمصاص(الإمتزاز) المناعي المرتبط بالانزيم (ELISA). ولتحديد نوع جراثيم السالمونيلا المعزولة بالاعتماد على جين 16SrRNA تم استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لإربعة عزلات شملت عينات من أيدي المربين ومن الفرشة ومن عينات الحمام غير البالغ والحمام البالغ والتعرف على التسلسل الجيني من خلال شجرة النشوء والتطور.

وللوقوف على فوعة جراثيم السالمونيلا المعزولة من الحمام تم استخدام ثلاث بادءات هي *IroN* و *IucC* و*IucD* على 10 عزلات أخذت من الحمام غير البالغ والحمام البالغ وبيئة التربية، أوضحت نتائج عزل جراثيم السالمونيلا من الحمام غير البالغ إن نسبة العزل من

الاعضاء الداخلية بلغت 24% ، 6% ،5.7%،2.8% و0% و0% لكل من مسحات الامعاء والكبد وفتحة المجمع و القلب والطحال و البنكرياس على التوالي وبنسبة كلية بلغت 9.23% ، نسبة عزل جراثيم السالمونيلا من الأمعاء كانت أعلى من بقية الاعضاء الاخرى، أما نسبة العزل في الأعضاء الداخلية للحمام البالغ فكانت كالآتي:36% ، 14%، 15% ،5% ،10% و0% لكل من مسحات الأمعاء والكبد وفتحة المجمع و القلب والطحال و البنكرياس على التوالي وبنسبة كلية بلغت 17% ، وكانت نسبة عزل جراثيم السالمونيلا من الأمعاء فيها ايضا أعلى من بقية الأعضاء الأخرى. وفيما يخص نسبة عزل جراثيم السالمونيلا من مسحات المحيط فقد بلغت 30%،22% ،6.66% و20% لكل من مسحات الفرشة والمعالف والمناهل وأيدي المربين على التوالي، وعليه فإن النسبة الكلية لعزل جراثيم السالمونيلا من الحمام وبيئتهُ هي 15% (العدد الكلي للعينات = 550 عينة) .

أوضحت النتائج أن المقاومة لـ 30 من عزلات السالمونيلا للمضادات الحيوية وجود مقاومة عالية للسيبروفلوكساسين (73.33%) يليها الكوليستين (70٪) ،والفلورفينيكول (66.6%)، ثم سلفاميثوكسازول–تريميثوبريم (60%)، لينكومايسين وأموكسيسيلين (46.6%) ، سبيرامايسين ودوكسيسايكلين (40%) ، تتراسيكلين (36.66%) ، ليفوفلوكساسين وإنروفلوكساسين (33.33%)، فوسفوميسين (26.6%) ، نورفلوكساسين (23.3%) ، سيفاليكسين ، نيومايسين وجنتاميسين (16.6%) . وفيما يخص انتاج عزلات السالمونيلا لانزيم البيتا لاكتاميز فقد اتضح أنَ النسبة باستخدام طريقة القياس الحمضي هي 13 عزله من 16عزلة (81.25٪) ، وبأستخدام طريقة انتشار القرص كان هناك 7عينات موجبة (43.75٪) للمضادات ذات الطيف الواسع (ESBL) وبنسبة مقاربة كان هناك أيضاً 6 / 16 (37.50٪) عينات موجبة للمضادات ذات الطيف الواسع ß -lactam نوع *ampC* (ESBL / *ampC*).

وأوضحت نتائج قياس مستوى الأضداد أن 5عينات من مجموع 23 (21.73٪) للحمام غير البالغ كانت موجبة لأضداد *Salmonella enteritides* باستخدام تقنية IDEXX iELISA بمعيار أضداد (681) وهو أعلى من معيار أضداد العينات السالبة (215.5) .اما في الحمام البالغ فقد ظهر إن 8 عينات من مجموع 69 عينة (11.59%) كانت موجبة لإضداد *Salmonella enteritides* وبمعيار أضداد (793.62) وهو أعلى من معدل العينات السالبة (202.65).

كانت نتائج تفاعل PCR للتسلسلات الجينية في عزلات السالمونيلا والمرسلة الى بنك الجينات GenBank والتي شملت غسول أيدي المربين ، و الفرشة ، والحمام غير البالغ و الحمام البالغ إن المسحة المأخوذه من غسول أيدي المربين تعود إلى

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium

كما وأظهرت النتائج ولأول مرة في العراق وفي محافظة نينوى تسجيل ثلاثة تسلسلات جينية جديدة وهي للعزلة المأخوذة من الفرشة وهي MO-A1 (LOCUS LC714863)، و من الحمام غير البالغ MO-A2 (LOCUS LC714864) ومن الحمام البالغ MO-A3 (LOCUS LC714865). أما فيما يخص عوامل الفوعة التي تحملها جراثيم السالمونيلا فقد اتضح إن عزلات السالمونيلا الـ10 من تلك التي تم فحصها حاوية جميعهاً على عوامل الضراوة *IucC* و *IucD* و *Iro N* الثلاثة وبنسبة (100%) .

University of Mosul
College of Veterinary Medicine

Prevalence of Salmonella producing β-lactamase in local pigeons at Nineveh province

Mohammed Jassim Mohammed Owaid

M.Sc./ Thesis

Veterinary Medicine/Veterinary Public Health

Supervised by:

Prof. Dr. Aqeel Mohammed Shareef khider

1444 A.H **2022 A.D**

Abstract

A study was conducted to elucidate the prevalence of Salmonella infection in squabs, adult pigeons and their rearing environment including feeders, waterers, litter and hands of breeders. The study involve 34 districts in Nineveh Governorate. Four hundred swabs were taken from the internal organs of squabs and adult pigeons and were as follows: 195 samples from squabs (aged less than 6 months), including 50 samples of intestines, 50 samples of livers, 35 samples from the cloaca, 35 samples of hearts, 20 samples of spleens and 5 samples of the pancreas.

from adult pigeons (more from 6 months), 205 samples were taken included 50 bowel samples, 50 liver samples, 40 samples from waterers, 40 heart samples, 20 spleen samples and 5 pancreatic samples.

As for the pigeon breeding surroundings, the samples included 50 litter samples, 50 feeder samples, 45 waterers samples and 5 breeders' hand wash samples.

Various transport, enrichment and solid media were used to isolate *Salmonella spp*. which were confirmed using various biochemical tests. For sensitivity testing to antimicrobials, 30 samples of Salmonella isolates were subjected to 16 different antibiotics, as well as the ability of 16 of the isolates were tested for their ability to produce beta-lactamase enzyme against beta-lactam antibiotics.

In addition, 23 blood samples were collected from squabs and 69 samples from adult pigeons were collected for estimation the level of antibodies against *Salmonella enteritides* using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method.

The Genetic sequence and phylogenetic tree of some of Salmonella isolates from squabs, adult pigeons and their environment was done.

To determine the virulence of the isolated *Salmonella spp*., three genes were used: *IroN*, *IucC* and *IucD* on 10 isolates taken from squabs, adult pigeons and their environment.

The results of isolating *Salmonella spp*. from squabs showed that the percentages of isolation from the internal organs were 24, 6, 5.7, 2.8, 0 and 0% for Intestine, Liver, Cloaca, Heart, Spleen and Pancreas, respectively, with a total percentage of 9.23%. The percentage of isolation of *salmonella spp.* from the intestine was significantly ($p \leq 0.05$) higher than the rest of the other organs.

The percentages of *Salmonella spp*. isolated from the internal organs of the adult pigeons were as follows: 36, 14, 15, 5, 10, and 0% from the Intestines, Liver, Cloaca, Heart, Spleen and Pancreas, respectively, with a total percentage of 17%. The percentage of isolating *Salmonella spp*. from the intestine was also significantly ($p \leq 0.05$) higher than the rest of the other organs.

Regarding the percentages of *Salmonella spp*. isolated from the surrounding they were 30, 22, 6.66, and 20% from the Litter, Feeder, Waterers, and breeders' hands samples.

Therefore, the total percentage of *Salmonella spp*. isolated from pigeons and their surrounding is 15% (total number of samples = 550 samples).

The results of antimicrobial resistance of 30 Salmonella isolates to 16 antibiotics were in a descending manner as follows: Ciprofloxacin (73.33%), followed by Colistin (70%), Florphenicol (66.6%), Sulfamethoxazole-trimethoprim (60%), Lincomycin and Amoxicillin (46.6%), Spiramycin and Doxycycline. (40%), Tetracycline (36.66%), Levofloxacin and Enrofloxacin ((33.33%), Fosphomycin (26.6%), Norfloxacin (23.3%), Cephalexin, Neomycin and Gentamicin (16.6%).

The result about the positive proportion of salmonella isolates for their ability in ß-lactamase enzyme production using the acidometric method were 3 out of 16 (18.75%); 7/16 (43.75%) by applying disc diffusion method and 6/16 (37.50%) were Positive to extended-spectrum ß-lactam type (*ampC*) (ESBL / *ampC*).

Salmonella antibodies level in squabs and adult pigeons showed that five samples from squabs out of 23 (21.73%) were positive to *Salmonella enteritides* antibodies using IDEXX iELISA technique with a titer of (681), which was significantly ($p \leq 0.05$) higher than the titer of negative samples (215.5). While for the adult pigeon, it appeared that 8 samples out of a total of 69 samples (11.59%) were positive to *Salmonella enteritides* antibodies with a titer of (793.62) which was also significantly ($p \leq 0.05$) higher than negative sample rate (202.65).

The results of the PCR reaction for the genetic sequences of Salmonella isolates that sent to the GenBank and taken from breeders' hand wash, litter, squabs, and adult pigeons showed that the sample taken from the breeders' hand wash belonged to *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium.* While and for the first time in Iraq and in Nineveh governorate, three new genes were registered and they were: Salmonella isolate from the litter MO-A1 (LOCUS LC714863), Salmonella isolate from squabs MO-A2 (LOCUS LC714864) and Salmonella isolate from adult pigeons MO-A3 (LOCUS LC714865).

With regard to the virulence factors borne by *Salmonella spp*., it was found that all Salmonella isolates tested (n=10), contained the virulence factors *IucC*, *IucD* and *IroN* with a percentage of (100%).