جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

عزل بعض أنواع البكتريا المعوية من مصادر سريرية ومن أنواع اللحوم ومنتجاتها ودراسة عوامل ضراوتها

مهند علي عزاوي عبدالله الجبوري

رسالة ماجستير

علوم الحياة / أحياء مجهرية

بإشراف

الأستاذ الدكتور

محسن أيوب عيسى احمد العكيدي

1444 هـ

2022 م

الخلاصة

اجريت الدراسة الحالية بِهدف التحري عن عوامل الضَراوة المختلفة وإنتشارها وتَوزيعها في عُزلات البكتريا المِعوية المَعزولة من مَصادر سريرية ومن أنواع اللحوم المختلفة، كذلك التحري الجزيئي عن إنتشار جينات مقاومة المُضادات الحيوية في هذه العزلات. جُمعت لهذا الغرض 66 عينة مختلفة لغرض عزل البكتريا المعوية منها للمدة من 1\9\2021 إلى 1\2\2022 شملت 30 عينة من مصادر سريرية (عينات ادرار Urine وعينات خروج Stool)، و36 عينة من مصادر لحوم مختلفة (لحوم حمراء وبيضاء طرية ومجمدة) أُجريت على العزلات الفحوصات التشخيصية المجهرية والزرعية الكيموحيوية اللازمة فضلاً عن التشخيص بجهاز الفايتك Vitek-2.

أظهرت النتائج تلوث كل أنواع اللحوم المدروسة بالبكتريا المعوية وبدرجات متفاوتة، إذ سَجلت لحوم الدجاج الطري النسبة الأكبر للتلوث البكتيري المعوي في هذه الدراسة إذ وصل لوغاريتم أعدادها / غم، حوالي (8.09)، في حين سَجلت عينات اللحوم المجمدة أقل نسبة تلوث، إذ تراوح لوغاريتم أعدادها / غم ما بين (4.71–5.67).

واستناداً إلى جميع الفحوصات التشخيصية المذكورة، تم الحصول على 22 عزلة سريرية و57 عزلة من اللحوم تنتمي للعائلة المعوية. توزعت البكتريا المعزولة بين 13 نوعاً مختلفاً تابعاً للعائلة المعوية وهي *Enterobacter spp* ، *Escherichia coli*، *Citrobacter koseri* ، *Citrobacter freundii* ، *Proteus vulgaris*، *Proteus mirabilis* ، *Klebsiella pneumoniae*، *Klebsiella oxytoca* ، *Shigella spp*، *Salmonella typhi* ، *Salmonella paratyphi A* ، *Providencia stuartii* و *Yersinia enterocolitica*. ، شكلت بكتريا *E. coli* نسبة العزل الأكثر (32%) من المصدر السريري (الخروج والادرار) تلتها *Enterobacter spp* بنسبة (18.2) وكل من *Proteus mirabilis* و *Citrobacter koseri* بنسبة (13.6) وبقية الأنواع كانت بنسب أقل. كما شكلت بكتريا *E. coli* كذلك نسبة العزل الاكبر من عينات اللحوم إذ بلغت (19%) تلتها *C. koseri* بنسبة عزل (16%) و *Proteus mirabilis* بنسبة (12.3%) وكل من بكتريا (*Enterobacter spp* و *Shigella spp*) بنسبة (10.5%) وبقية العزلات كانت بنسب أقل منها.

أُخضعت جميع العزلات قيد الدراسة والبالغ عددها (79) عزلة لفحص الحساسية تجاه المضادات الحيوية، لغرض معرفة مدى إنتشار صفة المقاومة للمضادات الحيوية بين هذه العزلات وأظهرت النتائج ان معظم العزلات كانت متعددة المُقاومة للمُضادات الحيوية Multi-Drug Resistant (MDR).

أختيرت العزلات الأكثر مقاومة للمضادات الحيوية والأكثر تواجداً في مصادر عينات اللحوم المختلفة، وهي (*Proteus mirabilis* ،*Enterobacter spp* ،*E.coli* ،*Citrobacter koseri*) قابلها اختيار أربع عزلات سريرية مماثلة لها لمقارنة مدى إنتشار وتواجد عوامل الضراوة المختلفة التي شملت قدرة إنتاج أنزيمات (Protease) ، (Lipase) ، (Licithinase) ، (Urease) ، (Hemolysin) ، (Beta-lactamase) وإنتاج الغشاء الحيوي (Biofilm). أظهرت النتائج أن جميع العزلات 100% كانت قادرة على إنتاج أنزيم (Beta-lactamase)، وإن (75%) و(100%) مِن عزلات اللحوم والعزلات السريرية على التَوالي كانت قادرة على إنتاج أنزيم Protease، وكان (25%) و(75%) من عزلات اللحوم والعزلات السريرية على التوالي كانت قادرة على إنتاج أنزيم Lipase، و(50%)، (75%) كل من عزلات اللحوم والعزلات السريرية على التوالي كانت قادرة على إنتاج أنزيم Licithinase، وكانت (50%) من كل عزلات اللحوم والعزلات السريرية قادرة على تكوين Biofilm، وان (25%) من عزلات اللحوم والعزلات السريرية انتجت انزيم Urease ، وأخيراً فيما يتعلق بانزيم Hemolysin فقد أنتج فقط من العزلات السريرية بنسبة (50%).

إستُخدِمَت تقنية PCR لإجراء إختبار التَحري عن وجود الجينات المُشفرة لإنتاج انزيمات Beta-lactamase وهي (***bla*** $_{\text{SHV}}$، ***bla*** $_{\text{TEM}}$، ***bla*** $_{\text{CTX-M}}$) لمعرفة مدى إنتشار وتَوزيع هذه الجينات في عزلات اللحوم والعزلات السريرية وبَينت النَتائج ان الجين ***bla*** $_{TEM}$ انتشر في جميع العزلات السريرية المختارة (100%) وانتشر في نصف عزلات اللحوم المختارة (50%)، في حين انتشر الجينان ***bla*** $_{SHV}$ و***bla*** $_{CTX\text{-}M}$ بنفس النسبة (75%) و(50%) على التوالي في كل من عينات اللحوم والعينات السريرية المختارة، وقد تشابهت العُزلات المتماثلة من مَصدري العزل في إمتلاكها على الأقل جين واحد من الجينات المدروسة.

بالمُقارنة مع العُزلات المرضية من المَصادر السريرية أظهرت عُزلات البكتريا المِعوية من اللحوم إمتلاك محتوى عالي من عَوامل الضراوة وجيناتها فضلاً عن مقاومة المُضادات الحيوية مما يَعكس خطورتها وأهَميتها الصحية.

Abstract

The current study was conducted with the aim of investigating different virulence factors, their prevalence and distribution in enteric bacteria isolated from clinical sources and different types of meat, as well as molecular detection of antibiotic resistance genes spreading in these isolates. For this purpose, 66 different samples were collected to isolating enteric bacteria from them for the period from 9/1/2021 to 1/2/2022, including 30 samples from clinical sources (Urine and Stool samples), and 36 samples from different meat sources (red and white meat, Fresh and frozen) The necessary microscopic and biochemical diagnostic tests were performed on the isolates, as well as the diagnosis with the Vitek2 system.

The results showed that all types of studied meat were contaminated with enteric bacteria to varying degrees, as fresh chicken meat recorded the largest percentage of enteric bacterial contamination in this study, where the logarithm of their numbers / g, reached about (8.09), while the frozen meat samples recorded the lowest contamination rate, as the logarithm of their numbers ranged /gm between (4.71-5.67).

Based on all the mentioned diagnostic tests, 22 clinical isolates and 57 meat isolates belonging to the enterobacteriaceae were obtained. The isolated bacteria were distributed among 13 different species belonging to enterobacteriaceae, *C. freundii, C. koseri, E.coli, Enterobacter spp, K. oxytoca, K. pneumoniae, P. mirabilis, P. vulgaris, P. stuartii, S.paratyphi A , S. typhi, spp. Shigella and Y. enterocolitica. E. coli* accounted for the highest isolation percentage (32%) from the clinical source (Stool and urine), followed by *Enterobacter spp*. (18.2), *Proteus mirabilis* and *Citrobacter koseri* (13.6), and the rest of the species had lower percentages. *E. coli* also formed the largest percentage of isolates from meat samples, which amounted to (19%), followed by *C. koseri* (16%) and *Proteus mirabilis* (12.3%) and each of (*Enterobacter spp and Shigella spp*) (10.5). %) and the rest of the isolates were at lower rates.

All of the (79) isolates under study were subjected to an antibiotic sensitivity test, to knowing the extent of the prevalence of antibiotic resistance among these isolates. The results showed that most of the isolates were multi-antibiotic resistant (MDR).

The isolates most resistant to antibiotics and most present in the sources of different meat samples, which are (*Citrobacter koseri, E.coli, Enterobacter spp, Proteus mirabilis*) were selected compared to the selection of four similar clinical isolates to compare the prevalence and presence of different virulence factors that included the ability to produce enzymes (Protease), (Lipase), (Licithinase, Urease), (Hemolysin), (Beta-lactamase) and biofilm production. The results showed that all isolates (100%) were able to produce Beta-lactamase , and that (75%) and (100%) of the meat isolates and clinical isolates, respectively, were able to produce Protease , and it was (25%) and (75 percent) %) of meat isolates and clinical isolates, respectively, were able to produce lipase, and (50%), (75%) of meat isolates and clinical isolates, respectively, were able to produce licithinase, and (50%) of meat isolates Clinical isolates are able to form biofilm, and that (25%) of meat isolates and clinical isolates produced Urease, and finally with regard to Hemolysin enzyme, it was produced only from clinical isolates by (50%).

PCR technique was used to detect the presence of the genes encoding the production of Beta-lactamase enzymes (*bla* $_{SHV}$, *bla* $_{TEM}$, *bla* $_{CTX-M}$) to determine the prevalence and distribution of these genes in meat and clinical isolates. The results showed that the *bla* $_{TEM}$ gene was spread in all clinical isolates (100%) and spread in half of the meat isolates (50%), while the genes *bla* $_{SHV}$ and *bla* $_{CTX-M}$ were spread with the same percentage (75%) and (50%), respectively, in both meat and clinical samples. The same isolates from the two isolate sources were similar in possessing at least one of the studied genes.

In comparison with pathogenic isolates from clinical sources, enterobacterial isolates from meat showed a high content of virulence factors and their genes, as well as antibiotic resistance, which reflects their risk and health importance.

University of Mosul

College of Sciences

Isolation of some enteric bacteria from clinical sources, meat, and meat products and study it's virulence factors

Muhannad Ali Azzawi Abdullah Al- Juboury

M.Sc. Thesis

Biology /Microbiology

Supervised By

Prof. Dr. Muhsin Ayoub Essa Ahmed Al- Ogaidy

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