استمارة مستخلصات رسائل واطاريح الماجستير والدكتوراه في جامعة البصرة

الكلية: الطب البيطري **اسم الطالب: دعاء مردان خالد**

القسم: احياء المجهريه **اسم المشرف: أ.د. باسل عبد الزهره عباس**

التخصص: احياء المجهريه **الشهادة: الماجستير**

عنوان الرسالة أو الأطروحة

التشخيص الجزيئي لجرثومة *Yersinia enterocolitica* ذات السميه المعويه و المعزوله من الحليب الخام والاجبان في البصرة ,جنوب العراق

ملخص الرسالة او الاطروحة

الخلاصـــة

تم جمع 300 عينه من الاسواق في محافظة البصرة من شهر تشرين الاول 2017 الى شهر شباط 2018تضمنت العينات 150 عينه حليب (50 كل من حليب بقر و جاموس و غنم) و 150 عينه50 اجبان كل من(جبن بقر و جاموس و غنم). نقلت هذه العينات الى وسط تربيتون سويابروث و فوسفيت بفر سلاين لتنشيط البكتيريا بشكل عادي وتنشيطها بالتبريد ايضا . أخذت مسحه من وسط التنشيط وزرعت بالتخطيط على وسط انتقائي للييرسينا *Yersinia selective agar* اضهر التنشيط بوسط تربيتون سويابروث نسب عاليه من عزلات ال*Y.enterocolitica* المتوقعه . 12 عزله من حليب البقر كانت النسبه (24%) , 11 عزله من حليب الجاموس (22%) و 6 عزلات من حليب الغنم (12%) , 11 عزله من جبن البقر (22%) , 10 عزلات من جبن الجاموس (20%) و 8 عزلات من جبن الغنم (12%) . في المقابل كان التنشيط بالفوسفيت بفر سلاين انتقائيه افضل للبكتيريا وذلك عن طريق تقليل اعداد عزلات المتوقع انها *Y.enterocolitica*. والنتائج تشير ان هنالك 7 عزلات من حليب البقر (14%) , 4 عزلات من حليب الجاموس (8%) , عزله واحده من حليب الغنم (2%) , 8 عزلات من جبن البقر (22%), 9 عزلات من جبن الجاموس (20%) و 7 عزلات من جبن الغنم (16%) . لقد كانت المستعمرات المتوقعة تنمو على الوسط الانتقائي وتمتلك مظهر شبيه بعين الثور(bulls eye appearance) اجري عليها اختبارات بايوكيميائية مثل اختبار الكتليز , اختبار الاوكسديز, اختبار الحركة , واختبار كليكلير ايرون اكار, واختبار اندول واضهرت هذه الاختبارات نتائج متطابقة ل *Y .entercolitica* . اضهرت نتائج الحليب ان البقر والجاموس ملوث بجرثومة *Y.entercolitica* بنسبه 8% يتبعها حليب الغنم بنسبه 4 % . واضهرت نتائج عينات الجبن ان البقر واجاموس انها ملوثه بهذه البكتريا بنسبه 8% و 6% . جبن الغنم ملوث بجرثومة *Y.enterocolitica* بنسبه 4% اضهرت نتيجة عينات الحيوانات ان البقر والجاموس ملوثة بالبكتريا بنسبه 8% و 7% على التوالي والغنم مصاب بنسبه 4 %. كانت النسبة الكلية لعزل هذه البكتريا من جميع الحيوانات (الغنم والبقر والجاموس) كانت بنسبه 6.33% . فحصت الحساسيه الدوائيه خمس عشرة عزله من مختلف المصادر بأستخدام 10اقراص مضادات حيويه .وكانت اكثر حساسيه دوائية كانت للمضاد الحيوي الستربيتومايسين والازيثرومايسين و الجينتامايسين وكانت النسبه 100% لكل منها يتبعها السايبروفلوكسين والكلورومفيليكول 93.3 % لكل منها . كانت اقل حساسيه وجدت باتجاه فايكومايسين 6.66% يتبعها الكلوكسلين 33.3% . لقد تم اختبار تفاعل سلسلة البولميريز (PCR) لكل العزلات بواسطة استخدام 16s rDNA اشارت النتائج ال (PCR) على ان كل العزلات تحمل الجين وكانت بحجم 1500bp. اختيرت ثلاث عزلات عشوائياً لغرض فحص تتابع القواعد دنا (DNA sequnace) اضهرت هذه العزلات تشابه 100% مع عزلات موصوفة في بنك الجينات . وتم عمل محاذات تتابع القواعد النتروجنيه لهذه العزلات الثلاث (DB30,DB34,DB37) مع تتابع عزلتين في البنك الجيني تحت الرقمين JX855135.1, JX424036.1 واضهرت النتائج بوجود تغير واحد في نتائج القواعد في موقع 0764كذلك تم رسم الشجرة التطورية للعزلات المحلية لليرسينا القولنيه مع عزلات مسجله سابقاً وكانت عزلاتنا اقرب الى عزلات مسجله في الصين . واظهرت نتيجة ال PCR لجينات الضراوه للجرثومة تحتوي على (inv) جين الاختراق , جيني الالتصاق (yadA) و (ail) . كل سلالات الجرثومه *Y.enterocolitica* تمتلك جين ال inv بنسبه 100% بالمقابل جين (ail) كانت سلاله واحده بنسبه 5.2 % و ال yadA بنسبه 26.3 %. اما جينات انتيروتوكسين فكانت نسبه تواجداها 0% لجين YstA و21%لجين YstA

College: Colleg of Veterinar **Name of Student: duaa Merdan KHalad**

Dep.:Microbiology **Name of Supervisor: basil A. abaas**

Certificatte: master **Specialization: Microbiology**

Tital of Thesis

Molecular Identification of Enterotoxogenic *Yersinia enterocolitica* Isolated from Raw Milk and Cheese in Basrah, South of Iraq

Abstract of Thesis

Summary

Three hundred samples were collected from several markets in Basrah province between October 2017 to February 2018. Sample included one hundred fifty milk sample 50 from each cow , buffalo and sheep and 150 total cheese sample 50 from each cow , buffalo and sheep. The sample transferred to TSB (Tryptone soya broth) and PBS(Phosphate buffer saline) for enrichment and cooled enrichment respectively. A loopful of culture was streaked on *Yersinia* Selective agar (YSA) plates. TSB enrichment showed high percentage of suspected *Yersinia* isolation. Twelve isolates from cow milk (24%), 11 isolates from buffaloes milk (22%), 6 isolates from sheep milk (12%), 11 isolates from cow cheese (22%), 10 isolates from buffaloes cheese (20%) and 8 isolates from sheep cheese (12%). In contrast PBS enrichment showed better selectivity to reduce bacterial number other than suspected *Yersinia enterocolitica* isolats. The results indicate that there were seven isolates from cow milk (14%), 4 isolates from buffaloes milk (8%), 1 isolate from sheep milk (2%) , 8 isolates from cow cheese (22%), 9 isolates from buffaloes cheese (20%) and 7 isolate from sheep cheese (16 %). The suspected colonies that grow on selective agar having bull eye appearance were subjected to biochemical identification (catalase test, oxidase test, motility test, Kligler Iron Agar test, indole test). The results of milk showed that cows and buffaloes milk contaminated with *Y. enterocolitica* at the percentage of 8% followed by sheep milk at the percentage of 4% . The results of cheese samples showed that cow's and buffaloes cheese were contaminated with this bacterium at the percentage of 8% and 6% respectively. Sheep cheese was contaminated with *Yersinia enterocolitica* at the percentage of 4%. The results of total animal samples showed that cow and buffaloes were contaminated with this bacterium at the percentage of 8% and 7% respectively. Sheep were contaminated with *Yersinia enterocolitica* at the percentage of 4% . The total percentage of isolation of this bacterium from all animals was 6.33%**.** Fifteen isolates from different source in current study were examined for their susceptibility to 10 antibiotics. The high susceptibility was found toward streptomycin ,azithromycin and Gentamycin, 100% for each, followed by Ciprofloxacin and Chloramphenicol, 93.3% for each. The low susceptibility was found toward vancomycin (6.66%) followed by Cloxacillin (33.3%). All strains were subjected to PCR analysis using 16S rDNA. The PCR result indicated in all strains with a band size 1500 bp. Three strains of *Yersinia enterocolitica* above were selected randomly for DNA sequencing which showed a 100% homology with that registered in GenBank. The results of Multiple sequence alignment of three strains of present study (DB30, DB34 and DB37) with two sequences of GenBank (JX855135.1 and JX424036.1) showed that there is a one change between the sequences at the locus 764 The phylogenic neighboring tree of local isolate of *Yersinia entercolitica* with previously registered isolates of *Yersinia enterocolitica* are closely related to that one of china. The result of polymerase chain reaction (PCR) for virulence genes was conducted including invasion (*inv*) gene, *Yersinia* adhesion A (*yad*A) and attachment invasion locus (*ail*) and enterotoxin genes *YstA* and *YstB.* All *Yersinia enterocolitica* strains having *inv* gene at the percentage of 100%. In contrast *ail* gene was found in one strain only at the percentage 5.2% while *yad* gene appears in 26.3% of the investigated strains. Enterotoxin genes present in strain at the percentage 21% for *YstA* and 0% for *YstA* gene .