الكلية :الطب البيطري
القسم : الاحياء المجهرية والطفيليات
التخصص :الاحياء المجهرية البيطرية

اسم الطالب : ميثم صباح صادق
اسم المشرف :أ.م.د. رشا منذر عثمان
الشهادة :الماجستير

رسم الشجرة الوراثية لبكتيريا *Salmonella enterica* المعزولة من الحيوان والانسان في محافظة البصرة وبغداد/العراق

ملخص الرسالة أو الأطروحة

السالمونيلا واحدة من اكثر الامراض المشتركة (التي تصيب الحيوان والانسان) انتشاراً في العالم سواءاً كان ذلك في الدول المتقدمة او الدول النامية مما يؤدي الى خسائر اقتصادية كبيرة بسبب الهلاكات في الثروة الحيوانية او زعزعة ثقه المستهلك بالمنتجات الحيوانية نتيجة الاصابة بالمرض.

تم اكتشاف اكثر من (2610) نوع مصلي من بكتيريا السالمونيلا في العالم لحد الان, وتتم عملية عزل وتشخيص السالمونيلا من خلال الطرق التقليدية باستخدام الاوساط الانتقائية او بالطرق المصلية والاختبارات الكيميائية الحياتية بالإضافة الى التشخيص على مستوى الوراثة الجزيئية والهندسة الوراثية باستخدام تقنية (PCR) عن طريق مضاعفة عينات الحمض النووي (DNA) للتسلسل المطلوب من القواعد في شريط ال(DNA) التي تشفر لجين معين, اضافة الى وجود الوسط الانتقائي التخصصي (CHROMagar) المستخدم حديثا في التشخيص.

استمرت فترة جمع العينات لمدة 10 اشهر ابتداء 2017 وشملت عدة مصادر : الانسان (العاملين في الحقول والمجازر اضافة الى مرضى مصابين بالإسهال من المستشفيات) الحيوان (ابقار من المجزرة, دواجن و بيض من الحقول والمنازل) ومصادر اخرى (ارضية الحقول والمجازر, مياه التصريف في الحقول والمجازر, ادوات الذبح المستخدمة) بلغ عدد العينات لجميع المصادر 300 عينة مقسمة الى 50 لكل مصدر, كان مكان جمع العينات من بغداد والبصرة وبواقع 25 عينة لكل مصدر في المدينة المعنية. تم استخدام التقنيات التقليدية والمعروفة في تشخيص السالمونيلا اضافة الى (CHROMagar) و تقنية (PCR) للوقوف عند نقاط القوة والضعف وايجاد اسرع وادق طريقة للتشخيص.

كان توزيع النتائج الموجبة للسالمونيلا بين المحافظتين شبه متساوي مع اختلاف بسيط بين مصادر العينات ويعزا ذلك الى طبيعة الحياة في المدينتين (مثلا الاعتماد على الاكل الجاهز في المدن المكتظة) او طبيعة الخزن للمواد الغذائية اضافة الى التلوث في البيئة. وكانت النتائج الفحوصات متطابقة بنسبة 100% بين ال(PCR) و(CHROMagar) في حين كان هناك تفاوت معنوي بين الاوساط الانتقائية التقليدية (XLD,SS) و اختبار (KIA) نتيجة اعتماد هذه الاوساط على خاصية توليد ثنائيهايدروجين الكبريت (H_2S) والتي تتواجد في انواع اخرى من البكتريا مما يؤدي الى خطأ في التشخيص, اضافة الى اختبار (API 20 E) الذي كان اقرب اختبار الى نتائج ال(PCR) و (CHROMagar) ولكن رغم ذلك كان فيه بعض النتائج التي يصعب تفسيرها مما يسبب خلل في التشخيص, ويعزا سبب ذلك لوجود بعض الالوان التي تكون قريبة لبعضها مثل اللون الشفاف واللون الشاحب الفاتح او ظهور لون غير موجود في دليل القياس المعتمد في التشخيص لهذا الاختبار مما يحتاج لوجود كادر متخصص في هذا الاختبار اضافة الى ذلك كان هنالك عامل الوقت حيث يحتاج اختبار (API 20 E) الى يومين مع عدد قليل من الاشرطة لكون العمل عليها يحتاج الى تركيز عالي مما يجعله غير فعال في فحص عينات كثيرة في وقت قياسي. في حين كان التشخيص بتقنية ال(PCR)و(CHROMagar) اكثر دقة وسرعة وسهولة في التشخيص.

ومن جهة اخرى تم تحليل نتائج تحديد التتابعات للجينات (spvC, avrA 16r RNA) باستخدام تحليل BLAST لمطابقة النتائج مع البنك الجيني العالم لمعرفة نسبة التشابه والاختلاف بين العزلة العراقية والعزل العالمية الموجودة وتم تشخيص اماكن الاختلاف وتأكد من كونها طفرة وراثية صحيحة ام مجرد تداخل بين القواعد وتم هذه المطابقة مع اقرب 100 عزلة في البنك الجيني العالمي لزيادة الدقة والتأكيد على التشابه والاختلاف وكان معدل التشابه في الجين الاول (97.77%) والجين الثاني(98.29%) والثالث(96.82%) .

وتم انشاء الشجرات الوراثية لكل جين من الثلاثة على حدى باستخدام طريقتين الاولى (الاكثر شبهاً ممكن) والثانية (اقل تطور موجود) مع اضافة مجموعة من العزل الاجنبية المسجلة في البنك الجيني العالمي لمعرفة موقع العزلة العراقية من هذه العزل وتم ايجاد ترابط بين السالمونيلا العراقية والعالمية في الجين الاول (16r RNA) لكون هذا الجين الاكثر ثباتا ويحتاج لفترات طويلة لحدوث طفرات وراثية لذلك هو معتمد في التصنيف العالمي للبكتريا. في حين امتازت السالمونيلا العراقية بمسارها الخاص في التطور عن العينات العالمية مع وجود بعض الترابط في بعض العينات او ارتباط بنفس الاجداد التي نهضت منه السالمونيلا المشخصة في العراق.

ويعزى سبب هذا التشابه والاختلاف بين العزلات الى عدة عوامل منها انتقال الحيوانات والمنتجات الحيوانية عبر الحدود وجود الانهر المشتركة والقاء المخلفات فيها قد يسبب انتقالها من مكان الى اخر التلوث البيئي من ضمنها المواد المشعة التي تسبب الطفرات الوراثية.

College: Veterinary Medicine **Name of student: Maitham S. Sadiq**
Dep: Microbiology and Parasitology **Name of supervisor: Assist. Prof. Dr. Rasha M. Othman**
specialization: Veterinary Microbiology **Certificatte: Master Degree**

Phylogenetic Tree Constructed of *Salmonella enterica* isolated from animals and human in Basra and Baghdad/Iraq

Salmonella is one of the most common diseases that affects the animals and humans worldwide, whether in developed countries or developing countries, resulting in large economic losses due to livestock production losses or the disruption of consumer confidence in animal products due to the disease.

More than 2,610 Salmonella serotypes have been discovered in the world until now. Salmonella is isolated and diagnosed using conventional methods using selective media or serological methods and biochemical tests, as well as diagnosis on the level of molecular genetics and genetic engineering by using (PCR) technique. By amplification of (DNA) samples for the required sequence in the (DNA) that encodes a particular gene, as well as the presence of the newly selected (CHROMagar).

The sample collection period was 10 months started from 2017 and involved several sources including: human (field workers and slaughterhouses workers, as well as patients suffering from diarrhea from hospitals) animal (cows from massacre, poultry and eggs from fields and houses) and other sources (like slaughter tools and draining water from field and the ground).The total number of samples for all sources was (300) samples divided into (50) for each source. The collection site of samples were involved Baghdad and Basra province with 25 samples for each source in the city . The traditional techniques known in the diagnosis of Salmonella plus (CHROMagar) and (PCR) were used to find the strengths and weaknesses points and to find the fastest and most accurate method of diagnosis.

The distribution of Salmonella positive results between the two cities was almost equal, with a slight difference between the sources of the samples and the nature of lifestyle in the two cities (e.g. depending on fast food in overcrowded cities) or the nature of food storage as well as pollution in the environment. The results of the tests were (100%) identical between (PCR) and (CHROMagar), whereas there was a significant difference between the traditional selective media (XLD, SS) and (KIA) test due to the depending of these media on the generation of sulfur dioxide (H_2S). The closest test to the results of (PCR) and (CHROMagar) was (API 20 E). But, there are some results that were difficult to interpret, which caused a defect in the diagnosis. This is due to the presence of some colors that are close to each other such as transparent color and light pale color or the appearance of color not found in the measurement manual book. In addition to this, there was a time factor where the (API 20 E) test requires two days of work to a few stripes of (API 20 E), because the work needs a high concentration of focus, making it ineffective in examining many samples at a short time. While the diagnosis of (PCR) and (CHROMagar) was more accurate, faster and easier.

On the other hand the results of sequences were investigated using BLAST analysis for matching with the (NCBI) to determine the similarities and differences between the isolation of Iraqi sample and the existing global isolation. The differences were identified and confirmed to be a true genetic mutation or a simple interference and noise between the bases. This was matched with the nearest 100 isolates in the (NCBI) to fix the similarity and difference. The similarity rate in the first gene (97.77%), the second gene (98.29%) and the third (96.82%).

The genetic trees of each of the three gene were set up separately using two methods (Maximum Likelihood) and the second (Minimum evolution) with the addition of a group of foreign samples recorded in the (NCBI) to determine the location of the Iraqi isolation samples from this national samples. The first gene is (16r RNA) because this gene is more stable and needs long periods for occurrence of genetic mutations is therefore certified in the global classification of bacteria, its sharing the evolution path with other national sample. While the Iraqi Salmonella was characterized by its own path in the development of global samples with some correlation in some samples or a link with the same ancestors that is emerged from.

The reason for this similarity and difference between the isolates is due to several factors, including the trans boundary movement of animals and animal products, the presence of common rivers and the pollution in them, which may cause their transmission from one place to another, and including the radioactive materials that cause genetic mutations.