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

Molecular Characterization of *Shigella sonnei* isolated from Diarrhoea in children under five years age and phage typing in Mosul/Iraq

Abbas Hashem Mohsen Marie

M.Sc. Thesis

Biology /Microbiology

Supervised By

Assistant Professor

Dr. Anmar Ahmed Dawood Al-Taie

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

Summary

This study was conducted to isolate *Shigella* spp. from (150) stool samples of children with both sex suffering from diarrhoea whose ages ranged from (1-60) months during the period from October 2021 to March 2022 in Mosul / Iraq. The isolates were diagnosed based on morphological, biochemical and physiological characteristics, and the diagnosis was confirmed by using Biochemicals test, API 20E and VITEK2 compact system.Their sensitivity to (14) types of antibiotics commonly used in the treatment of diarrhoea in children was carried out. The results of culture samples showed that (135) stool samples gave positive growth about (90%) of the total number of samples, while the other samples (15) samples did not show any growth (10%) on the isolated media.

The results showed that (17) isolates belong to *Shigella sonnei,* representing (12.59%) of the total number of isolates, The age group (49-60) months was in isolating to *Shigella sonnei* mostly present in age group (41.8%). Strains of *Shigella sonnei* had the ability to form biofilms, All strains of *Shigella sonnei* did not produce the enzymes Gelatinase, DNase,, Urease,, and all strains were not hemolysis blood on blood agar medium.

The antibiotic susceptibility test showed that all strains were resistant to the antibiotic Nalidixic acid(NA 30mg) 100%, and Ceftazidine 100%, Also, (82.35%) of the stains were resistant to the antibiotic Ampicillin(AMP 25mg) , While (88.23%) of the strains were sensitive to both Azithromycin (AZM15mg) and Chloramphenicol(C 10mg), Ciprofloxacin(CIP 10mg) showed an inhibitory effect,100% of the strains were sensitive to Imipenem and Amikacin. The third-generation of cephalosporin antibiotics such as Cefotaxime(CTX 5mg) and Ceftriaxone(CRO 10mg) had the ability to inhibit *Shigella sonnei* strains with the rate(70.58%) and (70.58%) respectively. The strains were sensitive to Cefixime(CFM 5mg) with a rate of (41.17%), and at (100%) to the antibiotic Imipenem and to Amikacin(AK 10mg) and Tetracycline(TE 10 mg),(64.70%)

and (58.8%) , the antibiotic Nitrofurantion(F 100mg), while resistant to the antibiotic Gentamicin(GN10 mg) 47.05% and the strains are resistant to the antibiotecs Ceftazidime(CAZ 10mg) was (100%).

The study also involved the isolation of specific bacteriophage for *Shigella sonnei* from sewage water and its titer was determined use for phage typing results.

The sequence analysis of the DNA was carried out, especially for the ribosomal 16S rRNA gene, it was relied upon because it is a fixed sequence that does not change over the years for bacterial species and genera. The DNA extract was sent to the Microgene Company to target the diagnostic gene 16SrRNA by adding the special Forward and Reverse primer genes and amplification and doubling polymerase chain reaction (PCR), It was found the sequence of gene for all the (17) samples was present in all strains. When comparing the duplicated bands, it was found that the bands were (1460) base pairs in size and at the same level for all types of strains. The results of these strains were compared for the genetic sequence with the gene sequence of the standard strains installed in the database Basic global Alignment Search Tool (BLAST) within National Center for Biotechnology Information (NCBI). The diagnosis was confirmed with a cause similarity ranging from (98- 100%).Found that the size of the nitrogenous bases reaches (1460) base pairs electroporation after 16SrRNA gene amplification by polymerase chain reaction (PCR).

الخلاصة

عزلت بكتريا الـ *Shigella* spp. من (150) عينة براز لأطفال يعانون من الإسهال ومن كلا الجنسين تتراوح أعمارهم بين (1–60) شهرًا خلال الفترة من تشرين الأول 2021 إلى آذار 2022 في مدينة الموصل / العراق. شخصت العزلات بناءً على الخصائص الشكلية ، الكيموحيوية والايضية، تم تأكيد التشخيص باستخدام عدة العمل، نظام API 20E و نظام VITEK2 ، وتم إختبار حساسيتها لـ (14) نوعًا من المضادات الحيوية التي يشيع استخدامها في علاج الإسهال عند الأطفال. أظهرت نتائج عينات الزرع أن (135) عينة براز أعطت نموًا إيجابيًا للبكتريا وبنسبة (90٪) من العدد الإجمالي للعينات ، بينما لم تظهر العينات الأخرى البالغة (15) أي نمو وبنسبة (10٪) على اوساط العزل.

أظهرت النتائج أن (17) عزلة تنتمي لـ *Shigella sonnei* بنسبة (12.59٪) من العدد الكلي للعزلات ، وضمن الفئة العمرية (49–60) شهراً . سلالات الـ *Shigella sonnei* لديها القدرة على تكوين الأغشية الحيوية . لا تنتج جميع سلالات إنزيم الجيلاتينيز ، الحمض النووي، اليوريز، لم تكن محللة للدم على وسط أكار الدم.

أظهر اختبار الحساسية للمضادات الحيوية أن جميع السلالات كانت مقاومة للمضاد الحيوي Nalidixic acid (NA 30mg) 100 ٪ ، كما أن (82.35٪) من السلالات كانت مقاومة للمضاد الحيوي Ampicillin (AMP 25mg) ، بينما (88.23٪) من السلالات كانت حساسة لكل من Azithromycin (AZM15mg) و Chloramphenicol (C 10mg) ، كان المضاد الحيوي Ciprofloxacin (CIP 10mg) له تأثيرًا مثبطًا وأظهرت النتائج أن (100 ٪) من السلالات كانت حساسة لها ، اماالجيل الثالث من المضادات الحيوية من السيفالوسبورين مثل (CTX Cefotaxime(5mg و Ceftriaxone(CRO 10mg) لها القدرة على تثبيط سلالات *Shigella sonnei* بنسبة (70.58٪) و (70.58٪) على التوالي،بينما كانت السلالات حساسة لـ Cefixime (CFM5mg) بمعدل (41.17٪) . وبنسبة (100٪) كانت حساسة للمضاد الحيوي (IPM10mg) Imipenem، بينما كانت السلالات حساسة لكل من المضاد الحيوي(AK10mg) Amikacin و Tetracycline(TE10mg) على التوالي (64.70٪) و (58.8٪) .

اما بالنسبة للمضاد الحيوي (Nitrofurantion F 100mg كانت السلالات حساسة بنسبة(58.82%)، بينما كانت السلالات مقاومة للمضاد الحيوي (Gentamicin (GN10 mg بنسبة(47.05%)، واظهرت جميع السلالات مقاومتها للمضاد الحيوي (Ceftazidime (CAZ 10mg) بنسبة (100%).

عزلت الملتقم البكتيري الخاص لبكتريا *Shigella sonnei* من مياه الصرف الصحي وتم تحديدعياريته لاستخدامها في تنميط العاثي.

أجري تحليل تسلسل الحمض النووي ، وخاصة بالنسبة للجين الريبوزومي 16S rRNA ، والذي تم الاعتماد عليه لأنه تسلسل ثابت لا يتغير على مر السنين للأنواع والأجناس البكتيرية. تم إرسال الحمض النووي المستخلص بعد إضافة جينات التمهيد الأمامي والعكسي الخاصة والتضخيم ومضاعفة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) إلى شركة Microgene لاستهداف الجين التشخيصي 16S rRNA ، وتم العثور على تسلسل الجين لجميع العينات (17). عند مقارنة النطاقات المكررة ، وجد أنها تتكون من (1460) زوجًا أساسيًا في الحجم وعلى نفس المستوى لجميع أنواع السلالات. تمت مقارنة نتائج هذه السلالات للتسلسل الجيني مع التسلسل الجيني للسلالات المعيارية المثبتة في قاعدة بيانات أداة المحاذاة العالمية الأساسية (BLAST) داخل NCBI. تم تأكيد التشخيص مع نسب تشابه يتراوح بين (98– 100٪). وجد أن حجم القواعد النيتروجينية يصل إلى (1460) زوجًا قاعديًا عند الترحيل الكهربائي على هلام الاجاروز.

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

التوصيف الجزيئي للشيكلا سوني *Shigella sonnei* المعزولة من اسهال الاطفال دون الخامسة من العمر والتنميط بالعاثي في الموصل/العراق

عباس هاشم محسن مرعي

رسالة ماجستير

علوم الحياة / الاحياء المجهرية

باشراف
الأستاذالمساعد
الدكتور أنمار أحمد داؤد الطائي

1444هـ 2022م