

**University of Mosul
College of Education
for Pure Science**



**Phenotypic and Genetic Study of *Enterobacter
cloacae* Isolated from Different Clinical Source**

Saja Dhiaa Al-Deen Mustafa Al-Radhwany

**Ph.D Thesis
Biology**

**Supervised by
Prof.
Dr. Hiyam Adel Ibrahim Al-Taee**

2022 A.D

1444 A.H

Abstract

The study included isolating and diagnosing *Enterobacter cloacae* bacteria, from patients they suffer from UTI urinary tract infection ,diabetic foot ulcers ,wound, burns infection and skin lesions in Al-khansaa and Al-sallam teaching hospitals in the city of Mosul,Of both sexes, with different ages ,ranging from 12-65 years, for period from September 2020 to January 2021. The study include two axes :

First axis: Hundred bacterial samples were collected from the above cases and diagnostic of the colonies growing on the culture media used in the study .The samples showed positive growth and diagnostic results appeared the 25 isolates belonged to *Enterobacter cloacae* ,45 isolates of *Escherichia coli*,11 isolates of *Pseudomonas* spp. And 7 isolates to *Staphylococcus* spp. .

Enterobacter cloacae isolates were distributed among clinical cases as follows : 19 isolates from urinary tract infection samples ,3isolates from diabetic foot ulcer and 1 isolate from burn smears,1 isolate from skin ulcer. Two isolates of *Enterobacter cloacae* isolated from the urine were selected and conducted . They had a biochemical diagnosis using the VITEK2 System, and the results showed the isolates belonged to *Enterobacter cloacae* , with a diagnosis rate of 95-97% as a type of isolation .The ability of the two isolates to form a biofilm was investigated phenotypically by Congo red agar method ,as the ability of the two isolates to produce a biofilm was observed through the formation of shiny black colonies .

Second axis: The study included the molecular diagnosis of the two isolates by conducting attest of PCR Poly Chain Reaction test using the primer designed for the 16s rRNA gene ,since this time the diagnosis of this bacterium belongs to it, and after transferring the product of the PCR

separator on an agarose gel with a concentration of 1.5 % and sensing it with ultraviolet rays ,bands appeared two parts (1250) base pair size for the two isolates separately , which means the presence of the gene carrying the special genetic code for a diagnostic trait this bacteria ,then ,the sequence analysis of the 16s rRNA gene in the two isolates showed that the gene contained variations (mutations) is some bases compared to what was found in the NCBI site , and it was of the transitional and transitional type. One this basis , the evolutionary relationships and genetic coexistences between the two isolates under study were identified. Among the isolates registered in the NCBI – gene bank for the same type around the world ,match ratio of 98-99% is attributed After the discovery of the genetic tree that explained the sequence of the nitrogenous bases of the previously mentioned isolates ,therefor , the two bacterial isolates in the NCBI-gene bank were registered as a special strains for Iraq in the name of SaHy-IQ-1, SaHy-IQ-2 *Enterobacter cloacae* .

Two *CsgA-CsgD* genes was carried out as part of the two operons known as the ciliary adhesion gene (Curli Fimbriae gene), which is responsible for encoding biofilm production .The results of the PCR reaction showed the presence of both genes with in the genome of both isolates.

الخلاصة

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص بكتريا *Enterobacter cloacae* من المرضى الذين يعانون من حالات التهاب المجاري البولية (UTI) Urinary tract infection، تقرحات القدم السكري، التهابات الجروح والحروق آفات جلدية من المراجعين لمستشفيات الخنساء والسلام التعليميين في مدينة الموصل ومن كلا الجنسين وبأعمار مختلفة تراوحت بين 12-65 سنة للفترة من أيلول 2020 ولغاية كانون الثاني 2021 وتضمنت الدراسة محورين :

المحور الأول: جمعت 100 عينة من الحالات أعلاه وأجريت لها اختبارات تشخيصية تضمنت الصفات الزرعية والمجهريّة للمستعمرات النامية على الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة واعطت جميع العينات نمواً إيجابياً وبيّنت نتائج التشخيص أن 25 عزلة تعود إلى *Enterobacter cloacae* و 45 عزلة إلى *Escherichia coli* و 11 عزلة إلى *Proteus* spp. و 12 عزلة إلى *Pseudomonas* spp. و 7 عزلات إلى *Staphylococcus* spp. توزعت عزلات بكتريا *Enterobacter cloacae* على الحالات السريرية وكالاتي:

19 عزلة من عينات الادرار و 3 عزلات من تقيحات القدم السكري، وعزلة واحدة من مسحات الحروق، وعزلة واحدة من التقرحات الجلدية .

تم اختيار عزلتان من *Enterobacter cloacae* المعزولة من الادرار واجري لهما التشخيص الكيموحيوي باستعمال جهاز VITEK2 system وظهرت النتائج عائلية العزلات إلى بكتريا *Enterobacter cloacae* وبنسبة تشخيص 95-97% وبحسب نوع العزلتان . تم التحري المظهري عن قدرة العزلتان على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة اكار احمر الكونغو اذ لوحظت قابلية العزلتان على انتاج الغشاء الحيوي من خلال تكوين مستعمرات سوداء لماعة .

المحور الثاني: تضمنت الدراسة التشخيص الجزيئي للعزلتان وذلك باجراء اختبار التفاعل التضاعفي لسلسلة ال DNA باستخدام البادئ المصمم للجين 16s rRNA اذ ان هذا الجين يؤكد تشخيص هذه البكتريا التي تعود اليه وبعد ترحيل نواتج تفاعل PCR على هلام الأكاروز بتركيز 1.5% وفحصه بالأشعة فوق البنفسجية ظهرت حزم بحجم جزيئي (1250) زوج قاعدي للعزلتين كلا على حدى مما يعني وجود الجين الحامل للشفرة الوراثية الخاصة لصفة تشخيص هذه البكتريا .تم تحليل التسلسل التتابعي لجين 16s rRNA في العزلتان وبيّنت النتائج احتواء الجين على تغايرات (طفرات) في بعض القواعد مقارنة بالموجود في موقع ال NCBI وكانت من النوع الانتقالي Transition والتحويلي Transversion وعلى هذا الأساس تم تحديد

العلاقات التطورية والتقاربات الوراثية بين العزلتين قيد الدراسة وبين العزلات المسجلة في NCBI-gene bank لنفس النوع حول العالم وينسب تطابق 98-99 % بعد الكشف عن الشجرة الوراثية التي توضح تسلسل القواعد النيتروجينية للعزلات المذكورة سابقا وعليه تم تسجيل العزلتين البكتيريتين المذكورتين في NCBI-gene bank كعزلات خاصة بالعراق وباسم *SaHy -IQ-1*, *SaHy -IQ-2 Enterobacter cloacae*.

تم اجراء الكشف الجزيئي للجينين *CsgA-CsgD* كجزء من الاوبرينين المعروفين بجين الالتصاق الهدبي *Curli Fimbriae gene* والمسؤول عن تشفير انتاج الغشاء الحيوي وقد بينت نتائج تفاعل ال PCR وجود كلا الجينين ضمن جينوم كلا العزلتين



جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

دراسة مظهرية ووراثية في بكتريا
Enterobacter cloacae المعزولة من مصادر سريرية مختلفة

سجى ضياء الدين مصطفى الرضواني

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة

ياشرف

الاستاذ

الدكتورة هيام عادل الطائي

٢٠٢٢ م

١٤٤٤ هـ