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

عزل وتشخيص جراثيم *Shigella* من حالات الإسهال والتحري عن التنوع الوراثي لبعض عزلاتها باستخدام مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال

عطاء طارق علي خليل الخليلي

رسالة ماجستير

علوم الحياة / أحياء مجهرية

بإشراف

الأستاذ الدكتورة

أميرة محمود محمد الراوي

1439هـ 2018م

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

عزل وتشخيص جراثيم *Shigella* من حالات الإسهال والتحري عن التنوع الوراثي لبعض عزلاتها باستخدام مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال

رسالة تقدمت بها

عطاء طارق علي خليل الخليلي

إلى

مجلس كلية العلوم في جامعة الموصل وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير

في

علوم الحياة / أحياء مجهرية

بإشراف

الأستاذ الدكتورة

أميرة محمود محمد الراوي

1439هـ 2018م

الخلاصة

أولت الدراسة الحالية اهتماما بعزل وتشخيص جراثيم *Shigella* من حالات الإسهال, إذ تم جمع (350) عينة خروج من حالات إسهال حاد مائي ودموي من المراجعين والمرضى الراقدين في مستشفى ابن سينا التعليمي ومستشفى الخنساء التعليمي للولادة والأطفال ومستشفى الموصل العام في مدينة الموصل خلال المدة من شهر كانون الثاني إلى منتصف شهر ايار للعام 2014 م .

أُخضعت هذه العينات للزرق المختبري للتحري عن الاصابة بأنواع جرثومة *Shigella* وأظهر الفحص نتائج إيجابية بوجود 18عزله لجراثيم *Shigella* أي بنسبة 5.1% عزلة, شخصت زرعيا بالاعتماد على صفات المستعمرات من حيث الشكل والحجم واللون والقوام, إذ تميزت مستعمراتها على وسط Xylose-Lycine desoxycholate agar (XLD) بكونها صغيرة الحجم, دائرية ملساء, ذات لون أحمر لعدم قدرتها على تخمر سكر الزايلوز, في حين ظهرت المستعمرات على وسط MacConkey agar (Mac) و Salmonella-Shigella agar (SSA) صغيرة الحجم, دائرية ملساء, عديمة اللون أو صفراء شاحبة، وذلك لعدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز, كما تم إجراء الفحص المجهري لشرائح محضرة من المستعمرات النامية لجرثومة *Shigella* والمصبوغة بصبغة كرام وأظهرت نتائج الفحص المجهري أنها سالبة لصبغة كرام عصوية مكورة, ولتحديد النوع تم التشخيص باستخدام نظام API 20 E ومصليا باستخدام المصول المضادة التجارية القياسية إذ أظهرت النتائج سيادة النوع *Shigella flexneri* على الأنواع الأخرى التي تم عزلها والتي تمثلت بالنوع *Shigella sonnei* وعزلة واحده تعود إلى النوع *Shigella boydii*.

أجري أختبار حساسية العزلات للمضادات الحيوية إذ فحصت حساسية أربعة عزلات *Shigella* , عزلتان للنوع *Shigella flexneri* وعزلتان للنوع *Shigella sonnei*, باستخدام (18) مضاد حيوي من مجاميع البنسلينات والسيفالوسبورينات والكينولينات وماكروليدات والامينوكلايكوسيدات, أظهرت النتائج أن العزلات الأربعة قيد الدراسة أبدت مقاومة للمضادات الحيوية الشائعة الاستخدام.

استخدمت تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الحامض النووي Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) وهي إحدى التقنيات المعتمدة على تفاعل PCR لتحليل التباين الوراثي وإجراء توصيف وراثي بين 10 عزلات غير معروفة النوع من جنس *Shigella* من بين كل العزلات المعزولة وتم تحديد المسافة الوراثية Genetic distance بينها.

تـم فـي هـذه الدراسـة اسـتخدام 6 بادئـات عشـوائية (OPF-16,OPD-20,OPA-06, OPE-20,OPX-01,OPY-03) أظهرت البادئات (OPA-06, OPD-20, OPF-16, OPE-20, OPX-01) حزما متباينة الأعداد والمواقع بين العزلات المدروسة والتي اختلفت في إظهارها لحزم فريدة مميزة Unique bands أو غياب حزمة رئيسية من نوع معين فيما لم يظهر البادئ (OPY-03) ناتج تضاعف, تم تسجيل نتائج التضاعف بالاعتماد على وجود أو غياب حزم الحامض النووي DNA المتضاعفة, وأظهرت اختلافات في الاوزان الجزيئية وعدد هذه الحزم, إذ أعطى البادئ (OPX-01) أكبر عدد من الحزم المتضاعفة (73) حزمة ,أما البادئ (OPD-20) فقد أعطى أقل عدد من الحزم (30) حزمة, أما بالنسبة لبقية البادئات فكانت عدد الحزم المتضاعفة يتراوح ما بين هذين الرقمين (30-73).

وتراوحت قيم البعد الوراثي للعزلات العشر بين (0.28742-0.88891) ففي حالة تطابق المادة الوراثية بين أي نوعين مدروسين فهذا يدل على أنَّ البعد الوراثي بينهما يجب أنْ يكون مساوياً للصفر أما نسبة التشابه الوراثية فتساوي 1.

وقد تم استخدام قيم البعد الوراثي بين العزلات العشرة في إيجاد العلاقة الوراثية التي تربطها جميعها وبشكل مجاميع Clusters إذ قسمت أنواع *Shigella* إلى مجموعتين رئيسة:

- المجموعة الرئيسة الأُولى تضمنت مجموعتين, الأُولى تضمنت فئتين أحدهما شملت العزلة رقم 1 والأُخرى شملت العزلتين 2 و3 أما الثانية فقد شملت مجموعتين فرعيتين, المجموعة الفرعيه الأُولى تضمنت فئتين أحدهما شملت العزلتين 4 و7 والأُخرى شملت العزلة 5 المجموعة الفرعية الثانية شملت عزلة واحدة وهي العزلة 6.
- المجموعة الرئيسة الثانية تضمنت فئتين أحدهما شملت العزلتين 8 و9 والأُخرى شملت العزلة 10 وجميع الفروع في الشجره تعد أنواع تابعه لجنس *Shigella*.

University of Mosul

College of Science

Isolation and Identification of *Shigella* from Diarrheal Cases and Investigation of its Genetic Diversity Using Random Amplified Polymorphic DNA

Ataa Tariq Ali Khalil Al-Khalily

M.Sc Thesis

in

Biology / Microbiology

Supervised By

Professor

Dr. Amera M. M. Al-Rawi

1439 A.H. **2018 A.D.**

University of Mosul

College of Science

Isolation and Identification of *Shigella* from Diarrheal Cases and Investigation of its Genetic Diversity Using Random Amplified Polymorphic DNA

M.Sc. Thesis submitted by

Ataa Tariq Ali Khalil Al-Khalily

To

The council of college of science university of Mosul in partial fulfillment of the requirements for the degree of master

In

Biology / Microbiology

Supervised By

Professor

Dr. Amera M. M. Al-Rawi

1439 A.H. **2018 A.D.**

Summary

Current study has rewarded attention to isolate *Shigella* from diarrheal cases, 350 fecal samples were collected for patients suffering from acute water and bloody diarrhea from Ibn Sina Teaching Medical Center, Al-Khansaa Teaching Hospital and Mosul General Hospital in Mosul during the period From January to mid-May 2014.

These samples were subjected to laboratory examination for the diagnosis of *Shigella*. The test showed positive results 18 isolates (5.1%) of *Shigella* that identified culturally depending on shape, size, color and growth texture, as the colonies of *Shigella* were characterized with small size, smooth, round and red color on (XLD) Xylose-Lycine desoxycholate agar due to its inability to ferment zylose ,while its colonies on MacConkey agar (Mac) and *Salmonella-Shigella* agar (SSA) were small, smooth, discolored, or pale yellow because they could not ferment lactose. Microscopic examination of *Shigella* was done smears prepared and stained with Gram stain, the cells appeared to be gram negative coccobacilli, diagnosis *Shigella* species was done using the API 20 E system and standard commercial specific antisera. The results showed the dominance of *Shigella flexneri* there on isolated of species, such as *Shigella sonnei* and one isolate of *Shigella boydii*.

The antibiotic sensitivity of four isolates was done, *Shigella flexneri* isolates and *Shigella sonne* isolates, against 18 antibiotics belonging to the groups of penicillins, cephalosporins, quinolins, macrolides and aminoclycosides. The results showed that the four isolates under study were resistant to common antibiotics under use.

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique was performed, this technique is based on PCR interaction to analyze genetic variation and genetic characterization among 10 *Shigella* isolates from unknown sources to detect the genetic distance between them .

In this study, 6 random primers were used (OPF-16, OPD-20, OPA-06, OPE-20, OPX-01, OPY-03) in RAPD technique, the results revealed that the primers (OPA-06, OPD-20, OPF-16, OPE-20, OPX-01) showed bands differed in numbers and locations between the studied isolates those were varied with the unique bands or in the absence of specific main band, while the primer (OPY-03) didn't gave any multiplication result, the differences in molecular weight the volumes and the difference in the number of these band were recorded ,the primer (OPX-01) gave the largest number of band (73 bands) and the primer (OPD-20) gave the lowest number of band (30 bands), while the rest of the primers gave different numbers of band approximated between (30-73).

The genetic distance between of the 10 isolates were ranged from 0.28742-0.88891. If the genetic material matches any two studied species, it indicates that the genetic distance between them should equal to zero, and the genetic similarity ratio equal to 1. The genetic distance among the ten isolates have been invested in finding the genetic relationship that binds them all on clusters, where the *Shigella* species are divided into two main groups: The first group includes two groups, the first includes two subgroups, one of which included isolate (No. 1) and the other included tow isolaties (No.2 and 3), the second was included two subgroups, the first subgroup included two categories, one of which included the isolates 4 and 7 and the other included isolate (No. 5), while the other one included the isolate (No. 6). The second main group included two categories, one of which included the isolates (No 8 and 9) and the other included isolate (No. 10) and all the branches in the tree are types of follow-up to the genus of *Shigella*.