Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and Scientific Research

University of Mosul

College of Science

Department of Biology

Diagnosis of some fastidious bacteria isolated from clinical specimens using molecular technology

Ayman Mohammed Khaleel Hasouni

Ph.D. Thesis

In

Biology / Microbiology

Supervised By

Professor

Dr. Hiyam Adel Ibrahim Altaii

Assistant Professor

Dr. Rayan Mazin Faisal Al-Obaidy

1445 A.H **2023 A.D.**

Abstract

Many bacterial pathogens fail for be isolated on cultural media for several reasons including antibiotic administration by patients, slow growth of some pathogens, low number of pathogens in the specimen, or the requirement of special nutrients and cofactors. Accordingly, specimens are miss diagnosed as negative where they might carry some pathogenic microbes. Therefore, developing new strategies for bacterial identification is important to provide better health quality.

This study aimed to directly diagnose bacterial pathogens from clinical specimens by amplifying and then sequencing their 16S rRNA gene. Results obtained were compared with traditional methods used in hospitals to diagnose pathogenic microbes and identify the efficiency of molecular methods compared to traditional methods in bacterial identification from clinical specimens. For this reason, a total of 120 samples were collected from cerebrospinal fluid (CSF) (n=50), blood (n=50) and Vaginal and cervical swabs (n=20) from patients hospitalized in Mosul city hospitals (Ibn Sena Hospitals, AL Kansaa Hospital, Ibn Al-Atheer Hospital) for the period from December, 2021 to April, 2022.

Traditional methods for bacterial isolation and identification from CSF and blood detected bacterial growth in 5/50 (10%) and 2/50 (4%) of the samples, respectively. For molecular diagnosis of CSF and blood specimens, DNA was extracted directly from the mentioned specimens, then their 16S rRNA gene was amplified by PCR using 16S rRNA universal primers (27F and 1522R). A positive result was recorded when a 1495bp band was detected from running the amplified product across agarose gel. Interestingly, results obtained from molecular diagnosis showed that 33 (66%) and 27 (54%) of CSF and blood specimens amplified the corresponding gene for 16S rRNA, suggesting the presence of pathogenic bacteria. The positive samples that amplified 16S rRNA gene were sent for DNA sequencing and their sequences were compared to counterparts submitted to National Center Biotechnology Information for the purpose of

bacterial identification. The results showed that 28 out of 45 negative specimens obtained from traditional identification method from Cerebral spinal fluid (62.2%) did actually contain bacterial pathogens as detected by molecular methods. Analysis of the 16S rRNA gene sequences showed that the bacteria detected belonged to six diffrent genera including: *Lactobacillus*, *Planococcus*, *Pseudomonas*, *Janibacter*, *Bacteroides* and *Achromobacter*. Our study detected for the first time worldwide the presence of *Planococcus* and *Janibacter* in CSF speciemns. This could be due to the special requirments for their isolation that are not provided in traditional methods. On the other hand, 25 out of 48 negaitive specimens obtained from traditional identification method from blood (52%) did actually contain bacterial pathogens as detected by molecular methods. Analysis of the 16S rRNA gene sequences showed that the bacteria detected belonged to nine different genera including: *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Janthinobacterium*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, and *Escherichia*.

Swabs were exposed to traditional methods for bacterial isolation and identification which involved growth on selective and rich media, studying their cultural characteristics, in addition to basic biochemical tests. Results showed that (11/20) 55% of the samples produced bacterial colonies on cultural media, while (9/20) 45% failed in producing colonies. On the other hand, genomic DNA was directly isolated from the same 20 Vaginal and cervical swab specimens and was used to amplify 16S rRNA gene. As expected, all the 20 specimens showed a positive result with direct amplification by 16S rRNA primers due to the presence of normal flora in the vaginal samples. Therefore, recombinant DNA technology was used to solve this issue using the Thymine Adenin cloning method. PCR products were cloned to pGEM-T easy vector via Thymine Adenin cloning and sequenced to identify the bacterial pathogens involved. Results showed that all Vaginal and cervical swabs amplified 16S rRNA gene products and when cloned to pGEM-T easy vector and sequenced, the bacteria detected included *Lactobacillus iners*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas synxantha*, and

الخُلاصة

تفشل العديد من مسببات الأمراض البكتيرية في امكانية عزلها على الأوساط الزرعية لعدة أسباب بما في ذلك تعاطي المضادات الحيوية من قبل المرضى، بطء نمو بعض مسببات الأمراض، انخفاض عدد مسببات الأمراض في العينة، أو الحاجة إلى عناصر غذائية وعوامل مساعدة خاصة. وفقًا لذلك، يتم تشخيص العينات بشكل خاطئ على أنها سلبية فيما قد تحمل بعض الميكروبات المسببة للأمراض. يعد تطوير استراتيجيات جديدة لتحديد البكتيريا أمرًا مهمًا لتوفير نظام صحي أفضل.

هدفت هذه الدراسة إلى التشخيص المباشر لمسببات الأمراض البكتيرية من العينات السريرية عن طريق تضخيم الجين 16S rRNA ومن ثم تحديد تسلسله النيوكليوتيدي. تمت مقارنة النتائج التي تم الحصول عليها مع الطرق التقليدية المستخدمة في المستشفيات لتشخيص الميكروبات المسببة للأمراض وتحديد كفاءة الطرق الجزيئية مقارنة بالطرق التقليدية في تشخيص البكتيريا من العينات السريرية . لهذا السبب تم جمع ١٢٠ عينة من السائل النخاع الشوكي (العدد=٥٠) والدم (العدد=٥٠) والمسحات المهبلية (العدد=٢٠) من المرضى الراقدين في مستشفيات مدينة الموصل(مستشفى ابن سينا ومستشفى الخنساء ومستشفى ابن الاثير) للفترة من كانون الأول ٢٠٢١ حتى نيسان ٢٠٢٢.

تمكنت الطرق التقليدية لعزل وتشخيص البكتيريا من سائل النخاع الشوكي والدم من عزل البكتيريا في ٥٠/٥ (١٠٪) و٥٠/٢ (٤٪) من العينات على التوالي. لغرض التشخيص الجزيئي للبكتريا المتواجدة في عينات سائل النخاع الشوكي وعينات الدم، تم استخلاص الحمض النووي مباشرة من العينات المذكورة، ثم تم تضخيم جين 16S rRNA الخاص بهم بواسطة تقنية الـ PCR باستخدام البادئات 27F و١٥٢٢R. تم اعتماد نتيجة إيجابية عندما كشف عن الحزمة ذات الحجم ١٤٩٥ زوج قاعدة على هلام الاكاروز. من المثير للاهتمام، أن النتائج التي تم الحصول عليها من التشخيص الجزيئي أظهرت أن ٣٣ و ٢٧ (٦٦٪ , ٥٤٪) من سائل النخاع الشوكي وعينات الدم ضخمت الجين 16S rRNA، مما يشير إلى وجود البكتيريا المسببة للأمراض. تم إرسال العينات الإيجابية الى الشركة المتخصصة بتحديد تسلسلات الحمض النووي وتمت مقارنة تسلسلها مع نظائرها المقدمة إلى NCBI لغرض التعرف على نوع البكتيريا. أظهرت النتائج أن ٢٨ من أصل ٤٥ عينة سلبية تم الحصول عليها من الطرق التقليدية، ان ٦٢,٢٪ من عينات النخاع الشوكي تحتوي بالفعل على مسببات الأمراض البكتيرية والتي تم الكشف عنها بالطرق الجزيئية. أظهر تحليل تسلسل الجين 16S rRNA أن البكتيريا المكتشفة تنتمي إلى ستة أجناس مختلفة بما في ذلك: *Lactobacillus* و *Planococcus* و *Pseudomonas* و *Janibacter* و *Bacteroides* و *Achromobacter*. اكتشفت دراستنا لأول مرة عالميا تواجد *Planococcus* و *Janibacter* في عينات سائل النخاع الشوكي وان عدم عزلهم بالطرق التقليدية قد يعود الى المتطلبات

الخاصة لعزلهم والتي لا تتوفر بالطرق التقليدية. من ناحية أخرى، فإن 25 من أصل 48 عينة سلبية تم الحصول عليها من الطرق التقليدية من الدم ان (52 ٪) تحتوي بالفعل على مسببات الأمراض البكتيرية كما تم الكشف عنها بالطرق الجزيئية. أظهر تحليل تسلسل الجين 16S rRNA أن البكتيريا المكتشفة تنتمي إلى تسعة أجناس مختلفة بما في ذلك: *Lactobacillus* و *Bacteroides* و *Pseudomonas* و *Klebsiella* و *Citrobacter* و *Janthinobacterium* و *Staphylococcus* و *Enterobacter* و *Escherichia*.

عرضت مسحات المهبل للطرق التقليدية لغرض عزل البكتيريا والتعرف عليها والتي تضمنت النمو على الوسائط الانتقائية والغنية، ودراسة خصائصها الزرعية، بالإضافة إلى الاختبارات الكيموحيوية. أظهرت النتائج أن (20/11) 55٪ من العينات أنتجت مستعمرات بكتيرية على الوسط الزرعى، بينما (20/9) 45٪ أخفقت فى إنتاج مستعمرات. من ناحية أخرى، تم عزل الحمض النووي الجيني مباشرة من نفس 20 عينة مسحة مهبلية واستخدمت لتضخيم جين 16S rRNA. كما متوقع اظهرت جميع العينات نتيجة موجبة للفحص الجزيئي وذلك لتواجد الفلورا الطبيعية في عينات مسحات المهبل ولهذا الغرض تم استخدام تقنية التهجين الوراثي بحل هذه المشكلة وباستعمال طريقة كلونة الثايمين-الادنين. حيث تم كلونة نواتج تفاعل البلمرة مع الناقل pGEM-T easy vector من خلال كلونة الثايمين- الادنين ثم حددت التسلسل الوراثي وعينت المسببات المرضية. النتائج اوضحت بأن جميع العينات ضخمت الجين المعني وعند كلونته بالناقل وتحديد تسلسله الوراثي تم تشخيص البكتريا *Lactobacillus iners* و *Streptococcus pyogenes* و *Pseudomonas synxantha* و *Lancefieldello rimae*. على الرغم من ان هذه الطريقة تتطلب وقت ومهارة الا انها اعطت نتائج ادق لم تتمكن الطرق التقليدية من توفيرها.

جمهورية العِراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامِعة الموصل / كُلية العلوم
قسم علوم الحياة

تشخيص بعض البكتريا صعبة الارضاء المعزولة من عينات سريرية باستخدام التقنيات الجزيئية

أَطروحة دكتوراه تقدم بِها

أيمن محمد خليل حسوني

إلى

مجلس كُلية العلوم جامِعة الموصل وهي جزء مِن مُتطلبات

نيل شهادة الدكتوراه في اختصاص فلسفة

علوم الحياة / علم الأَحياء المجهرية

بإشراف

أ.د. هيام عادل ابراهيم الطائي **أ.م.د. ريان مازن فيصل العبيدي**

١٤٤٥ هـ **٢٠٢٣ م**