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

التحري المظهري والجزيئي والتثبيطي لذيفانات الشايكا Shiga في السلالة O157:H7 للايشيريكا المعوية *Escherichia.coli* المعزولة من المصادر السريرية والبيئية في مدينة الموصل/ العراق

أنغام جبار علوان سلمان العكيدي

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة/ علم الاحياء المجهرية

بأشراف

ألاستاذ الدكتور محسن أيوب عيسى أحمد العكيدي

1445هـ 2023 م

الخلاصة:

عزلت وشخصت السلالة البكتيرية *Escherichia coli* O157*: H7* من مصادر مختلفة ودراسة امكانية تثبيط ذيفانها نوع الشايكا Shiga toxin (STX) باستخدام مواد ومركبات مختلفة، جمعت لهذا الغرض 225 عينة للفترة من 1 /1 /2022 الى 2022/6/30 توزعت مابين 135 عينة سريرية (85 عينة الاسهال ، 50 عينة ادرار) أخذت من مستشفيات السلام التعليمي، الجمهوري التعليمي، الموصل العام، وكذلك 35 عينة أغذية (لحوم مثرومة ، اجبان ، سلطة مطاعم) من الأسواق المحلية في مدينة الموصل . كما جمعت 55 عينة بيئية (30 مياه نهر ، 25 مياه المجاري).

اظهرت نتائج العزل والتشخيص الحصول على 165 عزلة تابعة لبكتريا *E.coli* شخص منها زرعيا 87 عزلة بنسبة (52.72%) على انها االسلالة *E.coli* O157:H7 باستخدام الوسط الانتخابي Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) توزعت على جميع مصادر العزل بنسب مختلفة، عينات الخروج (37.93%) والادرار (11.49%) أما الأغذية ومياه النهر فكانت نسبتها (17.24%) ، ومياه المجاري (16.09%).

استخدم في هذه الدراسة وسطين انتخابيين متخصصين بالسلالة *E.coli* O157:H7 وهما وسط CHROM agar ووسط E.coli O157:H7 لغرض تقييم كفاءة الوسط SMAC المستخدم في العزل والتشخيص الاولي بينت النتائج تباين هذه الاوساط الثلاثة في كفاءة تشخيص هذه السلالة ، وكان الوسط Chrom agar هوالافضل مقارنة ببقية الاوساط الانتخابية الاخرى المدروسة. اعتمدت نتائج هذا الوسط لغرض تقييم كفاءة التشخيص الزرعي مقارنة باستخدام طرق التشخيص المناعي بتقنية الاليزا Enzyme linked Immun Sorbent Assay (ELISA) والجزيئي Polymerase Chain Reaction (PCR) باعتماد الجين 16SrRNA، تمكنت طريقة الاليزا المناعية تأكيد تشخيص 39 عزلة (78%) من مجموع السلالات المشخصة زرعيا، بينما استطاعت الطريقة الجزيئية تأكيد تشخيص40 عزلة (80%) من مجموع هذه السلالات مما يعكس تباين في حساسية الطرق الثلاثة في الكشف عن هذه السلالة.

استخدمت كذلك تقنية تفاعل السلسلة المتبلمرة Polymerase Chain Reaction (PCR) للتحري عن الجينات المشفرة لذيفان الشايكا بنوعيها وتبين ان نسبة انتشار الجين *stx2* المشفر لسم الشايكا *stx2* أعلى(40%) مقارنة بالجين *stx1* المشفر لسم الشايكا STX1 ،حيث كانت نسبته (20%) في السلالات قيد الدراسة.

اجري تحليل التتابع الجيني للسلالات المنتخبة التي تمثلت بخمسة سلالات لكل مصدر عزل ، واعتمادا على تحليل التتابع الجيني للجين *16SrRNA* سجلت خمسة سلالات محلية جديدة تعود للسلالة*E.coli*O157:H7 ،بينما سجلت عشرة سلالات محلية جديدة تعود لهذه السلالة اعتمادا على تحليل التتابع الجيني للجينات *stx1* و *stx2* سجلت جميعاً في المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحيوية NCBI .

درس التاثير التثبيطي على ذيفان الشايكا للسلالة *E.coli* O157:H7 باستخدام ثلاثة عشرة مادة تمثلت بالمستخلصات النباتية الكحولية لاوراق النعناع، وقشور الرمان الكحولي والمواد الطبيعية وهي العسل والصمغ العربي والعكبر فضلاً عن استخدام بعض الزيوت النباتية وهي زيت القرفة ، زيت بذور الجرجير و زيت الصمغ العربي ، كما استخدمت بعض الاحماض العضوية وهي حامض اللاكتيك ، حامض الخليك ، حامض الاسكوربيك ، حامض الستريك و حامض الاوكزاليك . اظهرت المواد المثبطة المستخدمة قدرة تثبيطية عالية تجاه نمو السلالات المنتخبة ، وكانت الاحماض العضوية هي الأقوى في قدرتها التثبيطية وبتراكيز قليلة ، وتباينت هذه المواد في محتواها من المركبات الفعالة والمجاميع الوظيفية بعد اجراء تحليل هذه المركبات والمجاميع في المواد المثبطة المدروسة.

تم التحري عن إمكانية تثبيط ذيفانات الشايكا على المستوى الجزيئي من خلال التحري عن امكانية تثبيط التعبير الجيني Inhibition gene expression للجينات *stx1* و *stx2* ، واستخدمت تقنية تفاعل البلمرة الكمي اللحظي Quantitative Real time PCR لهذا الغرض واختيرت السلالة الغذائية ممثلة لبقية السلالات ، اظهرت النتائج تمكن مستخلص قشور الرمان الكحولي فقط من تثبيط التعبير الجيني للجينات *stx1* و *stx2* لما يقارب الى النصف وبقيم تراوحت ما بين 0.35 للجين الأول و0.41 للجين الثاني مقارنة بالتعبير الجيني لعينات السيطرة غير المعاملة، في حين لم تؤثر بقية المواد المدروسة على تثبيط التعبير الجيني بل ان معظمهم سبب زيادة في هذا التعبير لكلا الجينين .

تم الكشف عن السمية الخلوية لذيفانات الشايكا المدروسة على خط الخلايا (الخلايا اللمفاوية الطبيعية) ولأول مرة محليا باستخدام طريقة MTT Cytotoxicity assay وقد نجحت الطريقة بإظهار السمية الخلوية لذيفان الشايكا وتأكيد قابلية مستخلص قشور الرمان الكحولي في تثبيط ذيفان الشايكا للسلالات المدروسة مقارنة بعينة السيطرة .

of *stx1* and *stx2* genes, quantitative real-time PCR technique was used for this purpose, and the food isolate was selected as representative of the rest isolates, the results showed that alcoholic pomegranate peel extract only was able to inhibited the gene expression of *stx1* and *stx2* genes by nearly half with values ranged between 0.35 for the first gene and 0.41 for the second gene compared to the gene expression of the untreated control samples, while the rest of the studied materials did not affect the inhibition of gene expression, on the contrary most of them increase gene expression of both genes.

The cytotoxicity of the studied shiga toxins against cell line (normal lymphocytes) was detected for the first time locally using the MTT cytotoxicity assay method. The method succeeded in demonstrating the cytotoxicity of shiga toxins and confirming the ability of the alcoholic pomegranate peel extract to inhibit the shiga toxins of the studied isolates compared to the untreated control sample.

diagnosis of 40 isolates (80%) of the total number of these isolates, which reflects a variation in the sensitivity of the three methods in detecting this strain.

The (PCR) technique was also used to investigate the genes encoding the two types of shiga toxins. It was found that the prevalence of stx2 gene encoding Stx2 was higher (40%) compared to stx1 gene encoding Stx1, where it was (20%) in the isolates under study.

A genetic sequence analysis was conducted for the selected isolates, which consisted of five isolates for each source of isolation, and based on the analysis of the genetic sequence of the 16srRNA gene, five new local strains belonging to the strain *E.coli*O157:H7 were recorded, while ten new local strains belonging to this strain were recorded based on the analysis of the genetic sequence of genes *stx1* and *stx2* were all recorded at the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

The inhibitory effect against shiga toxin of *E.coli* O157:H7 was studied by using thirteen materials represented by alcoholic plant extracts of mint leaves, pomegranate peels, and natural substances, which are honey, arabic gum and propolis, as well as using some plant essential oils, includes cinnamon oil, watercress seed oil and gum arabic oil. Some organic acids were also used, lactic acid, acetic acid, ascorbic acid, citric acid, and oxalic acid. The used inhibitory materials showed a high inhibitory activity towards the growth of the selected isolates, and the organic acids were the most effective at low concentrations, and these materials varied in their content of active compounds and functional groups .

The possibility of inhibiting shiga toxins at the molecular level was investigated by investigating the possibility of inhibiting gene expression

Abstract:

The current study was conducted with the aim of isolating and diagnosing *Escherichia coli* O157: H7 strain from different sources and studying the possibility of inhibiting its Shiga toxin (STX), using different materials and compounds. For this purpose, 225 samples were collected from 1/1/2022 to 6/30/ 2022 distributed among 135 clinical samples (85 diarrhea, 50 urine) taken from Al-Salam Teaching Hospital, Al-Jamhouri Teaching Hospital, Mosul General Hospital, as well as 35 food samples (minced meat, cheese, restaurants salad) from the local markets in Mosul city . It also collected 55 environmental samples (30 river water, 25 sewage water).

The results of isolation and diagnosis showed that 165 isolates belonging to *E.coli*, of which 87 isolates with a rate of (52.73%) diagnosed as *E.coli* O157:H7 strain, using the SMAC (Sorbitol MacConkey Agar) selective media. They were distributed to all isolation sources in different percentages, (37.93%) stool, (11.49%) urine , food and river water (17.24%), and sewage water (16.09%).

In this study, two selective media for *E.coli* O157:H7 were used, CHROM agar medium and *E.coli* O157:H7 medium for evaluating the efficiency of the SMAC medium used in initial diagnosis. The results showed that these three media varied in the efficiency of diagnosing this strain, and the CHROM agar medium was the best compared to the other studied media. Then, the results of this medium were adopted for the purpose of evaluating the efficiency of cultural diagnosis compared to enzyme linked immunsorbent assay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR) technique using 16srRNA gene, the immunoassay method was able to confirm the diagnosis of 39 isolates (78%) of total culturally diagnosed isolates., while the molecular method was able to confirm the

The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Mosul/ College of Sciences
Department of Biology

Phenotypic , Molecular and Inhibitory Detection of Shiga Toxin of *Escherichia .coli* O157:H7 Isolated From Clinical and Environmental Sources in Mosul City /Iraq

A Dissertation Submitted to

The Council of College of Sciences/ University of Mosul in Partial

Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Doctor of Philosophy

In

Biology/ Microbiology

By

Angham Jabbar Alwan Salman Aloqaidy

Supervised By

Prof. Dr.

Muhsin Ayoub Essa Ahmed Aloqaidy

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