Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and

Scientific Research

University of Mosul / College of Science

Department of Biology

The Epidemiological and Molecular Screening of *Echinococcus granulosus* Parasite Strains in Nineveh Governorate

Sinan Khalid Abood Jasim

M.Sc. Thesis

In

Biology / Zoology

Supervised By

Assist. Prof.

Dr. Najah Sobhi Naef Al-Omar

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

Abstract

The current study was divided into three sections, the first of which was an analysis of the disease epidemiology of Cystic Echinococcosis. Cysts isolated from various organs of infected persons were surgically excised in Nineveh primary hospitals, Al Salam Teaching Hospital, Al-Jumhuri Teaching Hospital, and Mosul General Hospital. The second section involved molecular analysis of genotypic characteristics of animal and human hydatid cyst isolates collected from Nineveh. The third part comprised serological screening to discover specific anti-*Echinococcus granulosus* antibodies in a random sample of seemingly healthy persons in order to assess illness prevalence among healthy people in Mosul. Eighty-two patients were diagnosed with a hydatid cyst between June 2022 and March 2023 in Mosul, Iraq, according to clinical and surgical evidence in the above mentioned three hospitals. The prevalence of hydatidosis was greater in females than in males. Seven years old was the youngest infected patient, while sixty-five years old was the oldest. Females are infected at a rate of 45 (55%) greater than men at 37 (45%). There was a significant increase ($P<0.5$) in females compared to males. The incidence of hydatidosis infections was the greatest in those between the ages of 11 and 20. Compared to other organs, the proportion of liver infection was greater (60%), followed by the lung infection (37%). Students and housewives had the greatest infection rates according to their profession, while employees had the lowest percentages (2.44%). The majority of the patients were from the rural or semi-rural districts that surround Mosul. It was noted that, respectively, (76%) and (24%) of people coming from rural and urban regions. In terms of echinococcal cyst fertility, 87.80% (72/82) were fertile, with 75.63% of their protoscolices viable. Only 12.19% (10/82) of human cysts were confirmed to be sterile.

For the molecular study 10 random CE (5 from humans and 5 from sheep) were used from the germinal layer and possibly protoscolices. The isolated cysts were genotyped using molecular techniques. Human samples were taken from Mosul's main hospitals. Animal samples were gathered from Al-Saadoon Slaughter between June 2022 and March 2023. Both the protoscolices of fertile cystic fluid and the germinal layer of cysts (for humans and sheep) were used for

extracting DNA. To investigate molecular identification, polymerase chain reaction (PCR) amplification using partial mitochondrial 12S ribosomal ribonucleic acid (12S rRNA) and cytochrome c oxidase I (cox1) genes was carried out. The gene sequencer method and the phylogenetic tree analysis were conducted for the ten random PCR samples. The results showed the presence of the G1-G3 *E. granulosus* sensu stricto cluster genotype in Nineveh. The isolated cysts were analysed using the (12S rRNA) and (cox1) partial mitochondrial gene. The obtained products were sequenced and the sequences were aligned and compared, using the BLAST program of GenBank. All the PCR products were sequenced, but only two sequences were submitted to GenBank, one sample was selected from humans (accession number: LC757383), and the other was selected from sheep (accession number: LC757382).

For the phylogenetic analysis the results revealed that isolates of *E. granulosus* for humans as well as animals found in Nineveh exhibited the greatest genetic homology with isolates from Iran and Turkey that belonged to the sheep strain (G1) identified by NCBI-BLAST. The current investigation found that the sheep strain is the most common genotype in Nineveh, Iraq, and that this strain is responsible for cystic echinococcosis in both animals and humans.

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed in this study to detect the seropositivity of hydatidosis illness in seemingly healthy blood donors attending the major blood bank in Mosul. Serum samples were collected from 96 apparently healthy individuals aging 18-60 years during the period of this study. The results showed that 14 (14.58%) of the 96 individuals tested positive by ELISA.

الخلاصة:

تتسبب المرحلة اليرقية (الكيس المائي) من المشوكة الحبيبية في الحالة المرضية الخطيرة المعروفة باسم داء المشوكات الكيسي Cystic Echinococcosis (CE) ، والذي يعتبر مشكلة اقتصادية وصحية رئيسية على مستوى العالم. تم تقسيم الدراسة الحالية إلى ثلاثة أقسام ، كان أولها تحليلاً لوبائيات مرض داء المشوكات الكيسي حيث تم استئصال الأكياس المعزولة من مختلف أعضاء المصابين جراحياً في مستشفيات محافظة نينوى وهي كل من مستشفى السلام التعليمي والمستشفى الجمهوري التعليمي ومستشفى الموصل العام اما القسم الثاني من الدراسة فقد تضمن التحليل الجزيئي للخصائص الوراثية لعزلات الأكياس المائية حيواني. اشتمل الجزء الثالث على فحص مصلي لاكتشاف أجسام مضادة محددة لمضادات المشوكة الحبيبية في عينات عشوائية من الأشخاص الذين يبدو أنهم يتمتعون بصحة جيدة من أجل تقييم انتشار المرض بين الأشخاص الأصحاء في مدينة الموصل. تم تشخيص إصابة ٨٢ مريضًا بالأكياس المائية بين يونيو ٢٠٢٢ ومارس ٢٠٢٣ في الموصل ، العراق ، وفقًا للأدلة السريرية والجراحية في المستشفيات الثلاثة المذكورة أعلاه. كان انتشار داء الأكياس المائية أكبر في الإناث منه عند الذكور و كان أصغر مريض مصاب بعمر سبع سنوات، بينما كان أكبرهم يبلغ من العمر خمسة وستون عامًا. شخصت اصابة الإناث بمعدل ٤٥ (٥٥٪) أكبر من الرجال حيث كانت النسبة ٣٧ (٤٥٪). كانت هناك زيادة معنوية ($P < 0.5$) في الإناث مقارنة بالذكور.

كان معدل الإصابة أكبر في الأشخاص الذين تتراوح أعمارهم بين ١١ و ٢٠ عامًا. مقارنة بالأعضاء الأخرى ، كانت نسبة الإصابة بالعدوى الكبدية أكبر (٦٠٪) ، تليها عدوى الرئة (٣٧٪). وسجلت أعلى معدلات إصابة بين الطلاب وربات البيوت حسب المهنة، بينما سجل الموظفون أدنى نسبة إصابة (٢.٤٤٪). كان غالبية المرضى من المناطق الريفية أو شبه الريفية المحيطة بمدينة الموصل. ولوحظ أن (٧٦٪) و (٢٤٪) على التوالي ، جاءوا من مناطق ريفية وحضرية. من حيث خصوبة كيس المشوكات ، كانت ٨٧.٨٠٪ (٨٢/٧٢) خصبة ، مع ٧٥.٦٣٪ من الرؤيسات الخاصة بهم قابلة للحياة. تم التأكد من أن ١٢.١٩٪ (٨٢/١٠) فقط من الأكياس البشرية عقيمة.

بالنسبة للدراسة الجزيئية ، تم استخدام ١٠ عينات عشوائية من الأكياس (٥ من البشر و ٥ من الأغنام) من الطبقة الجرثومية و من الرؤيسات. تم التنميط الجيني للرؤيسات المعزولة باستخدام التقنيات الجزيئية. تم أخذ عينات بشرية من مستشفيات الموصل الرئيسية. جمعت عينات حيوانية من مجزرة السعدون بين يونيو ٢٠٢٢ ومارس ٢٠٢٣. واستخدمت كل من الرؤيسات من السائل الكيسي الخصب والطبقة الجرثومية من الأكياس (للبشر والأغنام) لاستخراج الحمض النووي. تم إجراء تضخيم تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) باستخدام جينات الريبوسوم الريبوزومية الجزئية 12S (12S rRNA) وجينات السيتوكروم ج أوكسيديز 1 (cox1). تم إجراء طريقة التسلسل الجيني وتحليل شجرة النشوء والتطور و أظهرت النتائج وجود النمط الوراثي العنقودي *Echinococcus granulosus* s. s. G1 هو السائد في

محافظة نينوى. تم تسجيل تسلسل العينات التي تم الحصول عليها وتمت محاذاة التسلسلات ومقارنتها باستخدام برنامج BLAST الخاص بـ GenBank. تم اجراء عملية تسلسل جميع عينات PCR ، ولكن تم تقديم تسلسلين فقط إلى GenBank ، وتم اختيار عينة واحدة من البشر (acc. No. LC757383)، وتم اختيار الأخرى من الأغنام (acc. No. LC757382).

بالنسبة لتحليل النشوء والتطور ، تم الكشف عن أن عزلات *E. granulosus* للإنسان وكذلك الحيوانات أظهرت أكبر تجانس وراثي مع عزلات من إيران وتركيا تنتمي إلى سلالة الأغنام (G1) التي حددتها NCBI. وجدت الدراسة الحالية أن سلالة الأغنام هي النوع الجيني الأكثر شيوعًا في محافظة نينوى بالعراق ، وأن هذه السلالة مسؤولة عن داء المشوكات الكيسي في كل من الحيوانات والبشر.

تم اجراء معايرة الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم (ELISA) في هذه الدراسة للكشف عن الإيجابية المصلية لمرض داء الأكياس المائية العدرية و قد جمعت عينات الدم عشوائيا من مراجعي مصرف الدم الرئيسي في مدينة الموصل بواقع ٩٦ عينة من اشخاص متبرعين يتمتعون بصحة جيدة و تتراوح اعمارهم بين ١٨–٦٠ عاماً وقد أظهرت النتائج أن ١٤ من أصل ٩٦ فرداً كانت نتيجة اختبار (ELISA) ايجابية و كانت النسبة ١٤.٥٨٪.

جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الموصل / كلية العلوم

التحري الوبائي و الجزيئي لسلالات طفيلي المشوكة الحبيبية في محافظة نينوى

سنان خالد عبود جاسم

رسالة ماجستير

علوم الحياة / علم الحيوان

بإشراف

أ.م.د. نجاح صبحي نايف العمر

١٤٤٥هـ

٢٠٢٣م