Ministry of Higher Education and

Scientific Research

University of Mosul

College of Science

Depart. of Biology

Bacteriological and Molecular Study of *Serratia* spp. isolates from Urinary Tract Infection and test of some plant extracts activity

Enas Muneer Abdulmageed

M.Sc. Thesis

In

Biology / Microbiology

Supervised By

Lecturer

Dr. Aws Ibrahim Sulaiman

1443 A.H. **2021 A.D.**

Summary

Two hundred samples were isolated from Ibn-Sena Teaching Hospital, Al-Salam Teaching Hospital and Al-Madina Private Clinical Laboratory in Mosul city /Iraq from the period of November 2020 to Febrauary 2021.All suspected isolates were identified by traditional methods, automated VITEK-2 system, identification by REGNUM PROKARYOTAE and molecular detection.

Statistical results of urinary tract infections (UTIs) showed that females were more affected than males (124) 62%, (76) 38% respectively.The general urine examination test shows that the number of non-infected people were (133) 66.5%, and the infected people (67) 33.5% whomever had the severe cases of bacterial infection.

The isolation results showed that *Escherichia coli* is the main causative agent of UTIs 45 (67.16%) , followed by *Klebsiella spp*. 15 (22. 38%), *Serratia spp*. 4 (5.97%) , and *Enterobacterspp.* 3 (4.47%) .

Four isolates belong to genus *Serratia spp.* three of them belong to *Serratia fonticola* and only one belong to *Serratia odorifera.*

Antibiotic susceptibility tests showed that the isolates are (100%) resistant to the following antibiotics: Ampicillin/Cloxacillin$_{30}$, Amoxicillin$_{30}$, Cephalothin$_{30}$, Ciprofloxacin$_{10}$, Ceftazidim$_{30}$ Norfloxacin$_{30}$ and Ceftriaxone$_{10}$ the resistance to Aztreonam$_{30}$. Levofloxacin$_{5}$ were 50% and Nitrofurantoin$_{100}$ 25% respectively.

The results of the minimum inhibitory concentration (MIC) of Levofloxacin$_{5}$ and Nitrofurantoin $_{100}$ were (100) µg/ml (50) µg/ml respectively.

The Extended Spectrum of β-Lactamases test showed that the isolates are (100%) resistant to these antibiotics Amoxicillin$_{30}$, Cefalothin$_{30}$, Ceftriaxone$_{10}$, Ceftazidim$_{30}$ and Aztreonam$_{30}$.

The affect of plants green tea and broccoli showed that there was no noticeable effect when using the extract alone, while the synergistic effect of the

plant extract with the antibiotic was observed by increasing the diameter of inhibition zone around tha antibiotics.

S.fonticola affected at the concentration (100) µg/ml of green tea with both Ciprofloxacin $_{10}$ and Levofloxacin$_5$, the same antibiotics has synergistic effect with broccoli at concentration of (25) µg/ml This means that the broccoli extract is more effective than green tea extract against *S. fonticola*.Nitrofurantoin $_{100}$ gave synergistic effect with green tea at the concentration (25)µg/ml while a concentration (50) µg/ml with broccoli extract,so Nitrofurantoin$_{100}$ was better to use in the treatment with green tea than broccoli. On the other hand the synergistic effect for both extracts on *S. odorifera* was at the concentration of (100) µg/ml with Nitrofurantoin$_{100}$ and (12.5) µg/ml with Levofloxacin so it's better to use Levofloxacin$_5$ with both green tea and broccoli during treatment period.

The isolated *Serratia* formed biofilm on modified Congo red agar and did not form it on Congo red agar.

The effect of plant extracts green tea and broccoli on biofilm formation showed its inhibitory effect on biofilm formation and the isolates transformed from weak to non-biofilm producing and the inhibition percentage of green tea for three *S fonticola* isolates was (0.190,0.063,0.053%) respectively and for *S.odorifera* (0.088%) and the inhibition percentage of broccoli on *S.fonticola* (0.15,0.038,0.029%) respectively , for *S odorifera* (0.005%) only. The effecte of green tea on biofilm inhibition more than broccoli.

The 16SrDNA gene was determined at (1400 bp) for both species *S.fonticola* ans *S.odorifera* and the resistance genes of both types were determined as follows:

Resistance to flouriquenolos antibiotics *gyrB* gene detected at (910pb). Indicated that (75%) of the isolates possess this gene while the *traT* gene detected at (288 bp) 100% of them possessed this gene. *LuxS* gene detected at

(102bp), indicated only (50%) of the isolates possess this gene and (50%) of the isolates possess the *smaI* gene detected at (73bp).

الخلاصة

تم جمع 200 عينة ادرار من مستشفى ابن سينا التعليمي ومستشفى السلام التعليمي ومختبر المدينة للتحليلات المرضية للمدة من شهر تشرين الثاني 2020 ولغاية شهر شباط 2021.

تم تشخيص البكتريا بواسطة طرق التشخيص التقليدية والتشخيص بجهاز Vitek-2 compact system والتشخيص بواسطة ABIS وايضا التشخيص الجزيئي لبعض عوامل الضراوة التابعة للبكتريا

اظهرت النتائج الاحصائية أن الاناث هن أكثر عرضة للإصابة بالتهابات المسالك البولية من الذكور اذ بلغ عددهن (124) 62% في حين بلغ عدد الذكور (76) 38% كما اظهرت نتائج الفحص العام لعينة الادرار أن عدد الاشخاص الاشخاص غير المصابين بالتهابات بكتيرية (133) 66.5% وأن عدد الاشخاص الذين اظهر الفحص المجهري لعينة الادرار اصابتهم بالبكتريا (67) 33.5%و كانت شدة الاصابة تتراوح بين قليل و (+)3 في الفحص المجهري لعينة الادرار.

اظهرت نتائج العزل أن بكتريا *E. coli* هي المسبب الأكثر شيوعاً في التهابات المسالك البولية حيث بلغ عددها (45) 70.31%، يليها بكتريا *Kelbsiella* إذ بلغت (15) 23.43%، يليها بكتريا *Serratia* اذا بلغ عددها (4) 6.25% ثم *Enterobacter* وعددها (3) 4.7%.

اظهرتنتائج التشخيص ان اربع عزلات فقط تابع *Serratia fonticol* وعددها (3) *Serratia odorifera* وعددها واحدة فقط.

اظهرت نتائج اختبارات فحص الحساسية باستخدام طريقة الانتشار بالقرص لـ كيربي – باور أن العزلات مقاومة 100% للمضادات التالية Ampicillin – Amoxicillin – Ceftazidim – Norfloxacin – Ciprofloxacin – Cephalothin – Ceftriaxone.

وانها مقاومة للمضادين Aztereonam – Levofloxacin بنسبة 50%، كما انها مقاومة بنسبة 25% للمضاد Nitrofurantoin.

اظهرت نتائج اختبار التركيز المثبط الادنى (MIC) أن التركيز المثبط الادنى للمضاد: Nitrofurantoin 50µg/ml – Levofloxacin 100µg/ml

كما اظهرت نتائج فحص انزيمات البيتا لاكتاميز ESBLs انها مقاومة 100% Amoxicilin – Aztereonam – Ceftazidim – Cefriaxone – Cephalothin.

اظهرت نتائج تأثير المستخلصات النباتية (الشاي الأخضر، البروكلي). أنه لا يوجد تأثير ملحوظ عند استخدام المستخلص لوحده في حين أن التأثير التأزري للمستخلص النباتي مع المضاد الحيوي لوحظ من خلال زيادة قطرمنطقة التثبيط للمضاد الحيوي.

اذ لوحظ أن التأثير التآزري للمضادات الحيوية والمستخلصات النباتية (الشاي الأخضر والبروكلي) على *S.fonticola* كان بتركيز 100 ميكروغرام / مل للشاي الأخضر مع كل من Ciprofloxacin و Levofloxacin ، وان هذه المضادات لها تأثير تآزري مع مستخلص البروكلي ايضا بتركيز 25 ميكروغرام/ مل وهذا يعني أن مستخلص البروكلي أكثر فعالية من مستخلص الشاي الأخضر على *S. fonticola* بينما لوحظ ان المضاد Nitrofurantoin يعطي تأثيرًا تآزريًا مع الشاي الأخضر بتركيز 25 ميكروغرام / مل بينما كان التاثير التازري عند التركيز 50 ميكروغرام / مل مع مستخلص البروكلي ، لذلك فان استخدام Nitrofurantion مع مستخلص الشاي الأخضر افضل استخدام مستخلص البروكلي. من ناحية أخرى ، كان التأثير التآزري لكلا المستخلصين على *S.odorifera* بتركيز 100 ميكروغرام / مل مع المضاد Nitrofurantion و 12.5 ميكروغرام / مل مع المضادLevofloxacin لذلك من الأفضل استخدام Levofloxacin مع كل من الشاي الأخضر أو البروكلي خلال فترة العلاج.

اظهرت النتائج أن البكتريا مكونة للبايوفلم على وسط Congo-red المحور وغير مكونة للبايوفلم على وسط Congo-red الاعتيادي.

أما تأثير المستخلصات النباتية (الشاي الأخضر، البروكلي) على تكوين البايوفلم فقد اظهرت المستخلصات قدرة تثبيطية على تكوين البايوفلم وتحولت من مكونة متوسطة للبايوفلم الى غير مكونة للبايوفلم وأن التأثير التثبيطي للشاي الاخضر كان أكبر من التأثير التثبيطي للبروكلي وبفروقات معنوية قليلة كما ان النسبة المئوية للتثبيط لمستخلص الشاي الأخضر لثلاث عزلات من نوع *S. fonticola* (0.190.063.0.053) و *S.odorifera* (0.088%) ونسبة تثبيط البروكلي *S.fonticola* (0.15.038.0.029٪) و *S.odorifera* (0.005٪).

تم تحديد جين 16Sr DNA (1400 bp) ولكلا النوعين وتم تحديد جينات المقاومة التي يمتلكها النوعين وكالتالي:

جين المقاومة للمضادات Flouroquenolones *gyrB* حيث اظهرت النتائج 75% من العزلات تمتلك هذا الجين.

جين *traT* اذ وجد أن 100% من العزلات موجبة لهذا الجين.

جين *Luxs* اظهرت النتائج أن 50% من العزلات تمتلك هذا الجين.

جين *SmaI* اظهرت النتائج أن 50% من العزلات يمتلك هذا الجين.

وزارة التعليم العالي والبحث العملي

جامعة الموصل

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

دراسة بكتريولوجية وجزيئية لعزلات من بكتريا *Serratia* spp. المعزولة من اخماج المسالك البولية واختبار فعالية بعض المستخلصات النباتية تجاهها

ايناس منير عبد المجيد

رسالة ماجستير

علوم الحياة / الأحياء المجهرية

بإشراف

الدكتور أوس ابراهيم سليمان نادر

1443هـ **2021 م**

Ministry of Higher Education and

Scientific Research

University of Mosul

College of Science

Depart. of Biology

Bacteriological and Molecular Study of *Serratia* spp. isolates from Urinary Tract Infection and test of some plant extracts activity

Enas Muneer Abdulmageed

M.Sc. Thesis

In

Biology / Microbiology

Supervised By

Lecturer

Dr. Aws Ibrahim Sulaiman

1443 A.H. **2021 A.D.**

Summary

Two hundred samples were isolated from Ibn-Sena Teaching Hospital, Al-Salam Teaching Hospital and Al-Madina Private Clinical Laboratory in Mosul city /Iraq from the period of November 2020 to Febrauary 2021.All suspected isolates were identified by traditional methods, automated VITEK-2 system, identification by REGNUM PROKARYOTAE and molecular detection.

Statistical results of urinary tract infections (UTIs) showed that females were more affected than males (124) 62%, (76) 38% respectively.The general urine examination test shows that the number of non-infected people were (133) 66.5%, and the infected people (67) 33.5% whomever had the severe cases of bacterial infection.

The isolation results showed that *Escherichia coli* is the main causative agent of UTIs 45 (67.16%) , followed by *Klebsiella spp*. 15 (22. 38%), *Serratia spp*. 4 (5.97%) , and *Enterobacterspp.* 3 (4.47%) .

Four isolates belong to genus *Serratia spp.* three of them belong to *Serratia fonticola* and only one belong to *Serratia odorifera.*

Antibiotic susceptibility tests showed that the isolates are (100%) resistant to the following antibiotics: Ampicillin/Cloxacillin$_{30}$, Amoxicillin$_{30}$, Cephalothin$_{30}$, Ciprofloxacin$_{10}$, Ceftazidim$_{30}$ Norfloxacin$_{30}$ and Ceftriaxone$_{10}$ the resistance to Aztreonam$_{30}$. Levofloxacin$_{5}$ were 50% and Nitrofurantoin$_{100}$ 25% respectively.

The results of the minimum inhibitory concentration (MIC) of Levofloxacin$_{5}$ and Nitrofurantoin $_{100}$ were (100) µg/ml (50) µg/ml respectively.

The Extended Spectrum of β-Lactamases test showed that the isolates are (100%) resistant to these antibiotics Amoxicillin$_{30}$, Cefalothin$_{30}$, Ceftriaxone$_{10}$, Ceftazidim$_{30}$ and Aztreonam$_{30}$.

The affect of plants green tea and broccoli showed that there was no noticeable effect when using the extract alone, while the synergistic effect of the

plant extract with the antibiotic was observed by increasing the diameter of inhibition zone around tha antibiotics.

S.fonticola affected at the concentration (100) µg/ml of green tea with both Ciprofloxacin $_{10}$ and Levofloxacin$_5$, the same antibiotics has synergistic effect with broccoli at concentration of (25) µg/ml This means that the broccoli extract is more effective than green tea extract against *S. fonticola*.Nitrofurantoin $_{100}$ gave synergistic effect with green tea at the concentration (25)µg/ml while a concentration (50) µg/ml with broccoli extract,so Nitrofurantoin$_{100}$ was better to use in the treatment with green tea than broccoli. On the other hand the synergistic effect for both extracts on *S. odorifera* was at the concentration of (100) µg/ml with Nitrofurantoin$_{100}$ and (12.5) µg/ml with Levofloxacin so it's better to use Levofloxacin$_5$ with both green tea and broccoli during treatment period.

The isolated *Serratia* formed biofilm on modified Congo red agar and did not form it on Congo red agar.

The effect of plant extracts green tea and broccoli on biofilm formation showed its inhibitory effect on biofilm formation and the isolates transformed from weak to non-biofilm producing and the inhibition percentage of green tea for three *S fonticola* isolates was (0.190,0.063,0.053%) respectively and for *S.odorifera* (0.088%) and the inhibition percentage of broccoli on *S.fonticola* (0.15,0.038,0.029%) respectively , for *S odorifera* (0.005%) only. The effecte of green tea on biofilm inhibition more than broccoli.

The 16SrDNA gene was determined at (1400 bp) for both species *S.fonticola* ans *S.odorifera* and the resistance genes of both types were determined as follows:

Resistance to flouriquenolos antibiotics *gyrB* gene detected at (910pb). Indicated that (75%) of the isolates possess this gene while the *traT* gene detected at (288 bp) 100% of them possessed this gene. *LuxS* gene detected at

(102bp), indicated only (50%) of the isolates possess this gene and (50%) of the isolates possess the *smaI* gene detected at (73bp).

الخلاصة

تم جمع 200 عينة ادرار من مستشفى ابن سينا التعليمي ومستشفى السلام التعليمي ومختبر المدينة للتحليلات المرضية للمدة من شهر تشرين الثاني 2020 ولغاية شهر شباط 2021.

تم تشخيص البكتريا بواسطة طرق التشخيص التقليدية والتشخيص بجهاز Vitek-2 compact system والتشخيص بواسطة ABIS وايضا التشخيص الجزيئي لبعض عوامل الضراوة التابعة للبكتريا

اظهرت النتائج الاحصائية أن الاناث هن أكثر عرضة للإصابة بالتهابات المسالك البولية من الذكور اذ بلغ عددهن (124) 62% في حين بلغ عدد الذكور (76) 38% كما اظهرت نتائج الفحص العام لعينة الادرار أن عدد الاشخاص الاشخاص غير المصابين بالتهابات بكتيرية (133) 66.5% وأن عدد الاشخاص الذين اظهر الفحص المجهري لعينة الادرار اصابتهم بالبكتريا (67) 33.5%و كانت شدة الاصابة تتراوح بين قليل و (+)3 في الفحص المجهري لعينة الادرار.

اظهرت نتائج العزل أن بكتريا *E. coli* هي المسبب الأكثر شيوعاً في التهابات المسالك البولية حيث بلغ عددها (45) 70.31%، يليها بكتريا *Kelbsiella* إذ بلغت (15) 23.43%، يليها بكتريا *Serratia* اذا بلغ عددها (4) 6.25% ثم *Enterobacter* وعددها (3) 4.7%.

اظهرتنتائج التشخيص ان اربع عزلات فقط تابع *Serratia fonticol* وعددها (3) *Serratia odorifera* وعددها واحدة فقط.

اظهرت نتائج اختبارات فحص الحساسية باستخدام طريقة الانتشار بالقرص لـ كيربي – باور أن العزلات مقاومة 100% للمضادات التالية Ampicillin – Amoxicillin – Ceftazidim – Norfloxacin – Ciprofloxacin – Cephalothin – Ceftriaxone.

وانها مقاومة للمضادين Aztereonam – Levofloxacin بنسبة 50%، كما انها مقاومة بنسبة 25% للمضاد Nitrofurantoin.

اظهرت نتائج اختبار التركيز المثبط الادنى (MIC) أن التركيز المثبط الادنى للمضاد: Nitrofurantoin 50µg/ml – Levofloxacin 100µg/ml

كما اظهرت نتائج فحص انزيمات البيتا لاكتاميز ESBLs انها مقاومة 100% Amoxicilin – Aztereonam – Ceftazidim – Cefriaxone – Cephalothin.

اظهرت نتائج تأثير المستخلصات النباتية (الشاي الأخضر، البروكلي). أنه لا يوجد تأثير ملحوظ عند استخدام المستخلص لوحده في حين أن التأثير التأزري للمستخلص النباتي مع المضاد الحيوي لوحظ من خلال زيادة قطرمنطقة التثبيط للمضاد الحيوي.

اذ لوحظ أن التأثير التآزري للمضادات الحيوية والمستخلصات النباتية (الشاي الأخضر والبروكلي) على *S.fonticola* كان بتركيز 100 ميكروغرام / مل للشاي الأخضر مع كل من Ciprofloxacin و Levofloxacin ، وان هذه المضادات لها تأثير تآزري مع مستخلص البروكلي ايضا بتركيز 25 ميكروغرام/ مل وهذا يعني أن مستخلص البروكلي أكثر فعالية من مستخلص الشاي الأخضر على *S. fonticola* بينما لوحظ ان المضاد Nitrofurantoin يعطي تأثيرًا تآزريًا مع الشاي الأخضر بتركيز 25 ميكروغرام / مل بينما كان التاثير التازري عند التركيز 50 ميكروغرام / مل مع مستخلص البروكلي ، لذلك فان استخدام Nitrofurantion مع مستخلص الشاي الأخضر افضل استخدام مستخلص البروكلي. من ناحية أخرى ، كان التأثير التآزري لكلا المستخلصين على *S.odorifera* بتركيز 100 ميكروغرام / مل مع المضاد Nitrofurantion و 12.5 ميكروغرام / مل مع المضادLevofloxacin لذلك من الأفضل استخدام Levofloxacin مع كل من الشاي الأخضر أو البروكلي خلال فترة العلاج.

اظهرت النتائج أن البكتريا مكونة للبايوفلم على وسط Congo-red المحور وغير مكونة للبايوفلم على وسط Congo-red الاعتيادي.

أما تأثير المستخلصات النباتية (الشاي الأخضر، البروكلي) على تكوين البايوفلم فقد اظهرت المستخلصات قدرة تثبيطية على تكوين البايوفلم وتحولت من مكونة متوسطة للبايوفلم الى غير مكونة للبايوفلم وأن التأثير التثبيطي للشاي الاخضر كان أكبر من التأثير التثبيطي للبروكلي وبفروقات معنوية قليلة كما ان النسبة المئوية للتثبيط لمستخلص الشاي الأخضر لثلاث عزلات من نوع *S. fonticola* (0.190.063.0.053) و *S.odorifera* (0.088%) ونسبة تثبيط البروكلي *S.fonticola* (0.15.038.0.029٪) و *S.odorifera* (0.005٪).

تم تحديد جين 16Sr DNA (1400 bp) ولكلا النوعين وتم تحديد جينات المقاومة التي يمتلكها النوعين وكالتالي:

جين المقاومة للمضادات Flouroquenolones *gyrB* حيث اظهرت النتائج 75% من العزلات تمتلك هذا الجين.

جين *traT* اذ وجد أن 100% من العزلات موجبة لهذا الجين.

جين *Luxs* اظهرت النتائج أن 50% من العزلات تمتلك هذا الجين.

جين *SmaI* اظهرت النتائج أن 50% من العزلات يمتلك هذا الجين.

وزارة التعليم العالي والبحث العملي

جامعة الموصل

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

دراسة بكتريولوجية وجزيئية لعزلات من بكتريا *Serratia* spp. المعزولة من اخماج المسالك البولية واختبار فعالية بعض المستخلصات النباتية تجاهها

ايناس منير عبد المجيد

رسالة ماجستير

علوم الحياة / الأحياء المجهرية

بإشراف

الدكتور أوس ابراهيم سليمان نادر

1443هـ **2021 م**