بسم الله الرحمن الرحيم

Sudan University of Science and Technology
College of Graduate Studies

Genotypic detection of the Virulence Factors of Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Diarrheic and Urinary Tract Infected Patients in Khartoum State

الكشف الجزئي عن عوامل الضراوة في بكتريا الاشريكية القولونية المسببة لعدوى المسالك البولية و الاسهالات في مرضى من ولاية الخرطوم

A Dissertation submitted in partial fulfillment of the requirement of M.Sc. in medical laboratory science (Microbiology)

By:

HusamEldin Mohamed Hassan Musa

B.Sc. of Medical Laboratory Science, Karari University, 2014

Supervised by:

Dr. Hisham Nouraldayem Altayeb Mohammed

(B.Sc, M.Sc and Ph.D)

July, 2017

بسم الله الرحمن الرحيم

قال تعالى:

آمَنَ الرَّسُولُ بِمَا أُنزِلَ إِلَيْهِ مِن رَّبِّهِ وَالْمُؤْمِنُونَ كُلٌّ آمَنَ بِاللَّـهِ وَمَلَائِكَتِهِ وَكُتُبِهِ وَرُسُلِهِ
لَا نُفَرِّقُ بَيْنَ أَحَدٍ مِّن رُّسُلِهِ وَقَالُوا سَمِعْنَا وَأَطَعْنَا غُفْرَانَكَ رَبَّنَا وَإِلَيْكَ الْمَصِيرُ

صدق الله العظيم

سورة البقرة الآية 285

Dedication

I dedicate this work:

To whom breastfed me the love and compassion to the symbol of love, and healing balms to pure whiteness heart.

(My mother)

To who spend His life working to give me a drop of love and happiness to that who pave my way to science to the big heart?

(My father)

To the pure hearts and innocent souls to my life basil's.

(My brothers and sister)

Now open the sails and raise the anchor for the ship to start running in the dark sea, the sea of life there is no light in this darkness except candles of distant memory, to those I loved them and loved me.

(My friends)

For all world nation that fight for life, for all Islamic nations and our lovely home.

Best wishes…

Acknowledgement

First of all, a great thanks to Almighty **Allah** for helping me to finish this study.

My deepest gratitude to my supervisor **Dr.HishamNouraldayemAltayeb Mohammed**, for his guidance, criticism and advice which made this work easy to achieve.

My great thanks to staff members of Microbiology Department, Sudan University of Science and Technology, they have stellar education program.

I am also grateful to staff of the Research Laboratory, Sudan University of Science and Technology for their help and support during laboratory work.

I am grateful to my patients for their co-operation and consent to collect the clinical specimens used in this project.

Lastly, my Thanks and appreciation to all those who supported me to achieve this work.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the virulence factor of Uropathogenic*E.coli* isolated from diarrheic and urinary tract infected patients in Khartoum State by multiplex PCR assay. A total of 100 clinical specimens(50 urine, 50 diarrhea) were collected in this study. Urine samples were culture on CLED agar, while diarrhea samples were culture on MacConky agar,identification scheme was done by conventional method. Modified Kirby-bauer method was performed using the following antibiotic discs; Gentamicin,Amikacin, Ciprofloxacin and Co-trimoxazole.Fifty five percent of samples were found sensitive to Gentamicin, 96% were sensitive to Amikacin, 57% weresensitive to Ciprofloxacin and 63% were sensitive to Co-trimoxazole. Boiling method was adopted for DNA extraction.Finally Multiplex PCR was done for thedetection of *E. coli*virulent genes(*pap, fim, sfa, aer and hly*).

Most study population were females 57(57%); 42 of them suffering from UTIs and 15 suffering from diarrhea, while males were 43(43%); 8 of them were suffering from UTIs and 35 of them were suffering from diarrhea. Among enrolled subjects, 82 were positive for one or more Uropathogenic *E. coli* virulent genes. While18 isolates were negative for all genes. The results of multiplex PCR searching for different virulent factors revealed the following:Thirty tow (n=32) diarrheal samples appear as*aer* gene positive while the remaining fourteen (n=14) urine samples appear as *aer* gene positive. Thirty three (n=33) urine samples appear as *fim* gene positive while the remaining eight (n=8) diarrheal samples appear as *fim* gene positive. Twenty four (n=24) urine samples appear as *pap* gene positive while the remaining nine (n=9) diarrheal samples appear as

*pap*gene positive. Fourteen (n=14) urine samples appear as *hly* gene positive while the remaining three (n=3) diarrheal samples appear as *hly* gene positive. Fifteen (n=15) urine samples appear as *sfa* gene positive while in diarrheal samples was not detected. The study concluded that *fim* gene was highly prevalent among UTIs patients, *aer* gene was high prevalent among diarrhea patients and Amikacin is the most effective antibiotic

المستخلص

هـدفت هـذه الدراسـة الـى تحديـد عوامـل الضـراوة فـي البكتيريـا الاشـكريكية القولونيـة المسـببة لعـدوى المسـالك البويـة المعزولـة مـن مرضـى الإسـهال ومرضـى المسـالك البوليـةفي ولايـة الخرطـوم, حيثـتم الكشـف عنهـا عـن طريـق فحـص تفاعـل البلمـرة المتعـدد المحتـوي علـى عـدة بادئـات. تـم جمـع100 عينـة (50 عينـة بـول، 50 عينـة إسـهال) فـي هـذه الدراسـة. ثـم تـم تزريـع عينـات البـول علـي وسـط CLED وعينـات الاسـهال علـى وسـطMacConkey و تـم التعـرف علـي البكتريـا بـالطرق التقليديـة. تـم اسـتخدام طريقـة Kirby-bauer المطـورة لاجـراء إختبـار الحساسـية باسـتخدام اقـراص المضـادات الحيويـة التاليـة:جنتاميسـين، أميكاسـين، سيبروفلوكساسـين والكوتريموكسـازول وجـدنا أن55% مـن العينـات حساسـة للجنتاميسـين، 96٪ حساسـة للأميكاسـين، 57٪ حساسـة للسيبروفلوكساسـين و 63٪ حساسـة للكوتريموكسـازول. تـم اسـتخدام طريقـة الغليـان لاسـتخراج الحمـض النـووي.اخيـرا تـم إجراء إختبـار تفاعل البلمرة المتعدد المحتوي علـي عدة بادئـات للكشـف عـن عوامـل الضـراوة (*pap, fim, sfa, aer andhly*) في بكتريا الاشريكية القولونية.

وكـان معظـم المشـاركين فـي الدراسـة مـن الإنـاث 57 (57٪)؛ 42 مـنهم يعـانون مـن عـدوى المسـالك البوليـة و 15 مـنهم يعـانون مـن الإسـهال، فـي حـين بلـغ عـدد الـذكور 43 (43٪)؛ 8 مـنهم يعـانون مـن التهـاب المسـالك البوليـة و 35 مـنهم يعـانون مـن الإسـهال. مـن عينـات الدراسـة، كانـت 82(82%) عينـة إيجابيـة لواحـدة أو أكثـر منجينـات الضـراوة . بينمـا كانـت 18(18%) عينـة سـلبية لجميـع الجينـات. نتيجـة اختبـار تفاعـل البلمـرة المتعـدد المحتـوي علـي عـدة بادئـات للكشـف عـن عوامـل

الضـراوة كانـت كالتـالي:اثنـين و ثلاثـون (ن=32) عينـة إسـهال ظهـرت موجبـة للجـين *aer*و المتبقـي اربعـة عشـر (ن=14)عينـة بـول ظهـرت موجبـة للجـين *aer*. ثلاثـة و ثلاثـون (ن=33) عينـة بـول ظهـرت موجبـة للجـين*fim*و المتبقـي ثمانيـة (ن=8) عيناتإسـهال ظهـرت موجبـة للجـين *fim*. اربعـة و عشـرون (ن=24) عينـة بـول ظهـرت موجبـة للجـين*pap*و المتبقـي تسـعة (ن=9) عيناتإسـهال ظهـرت موجبـة للجـين *pap*. اربعـة عشـر (ن=14) عينـة بـول ظهـرت موجبـة للجـين *hly* و المتبقـي ثلاثـة (ن=3) عيناتإسـهال ظهـرت موجبـة للجـين *hly*. خمسـة عشـر (ن=15) عينـة بـول ظهـرت موجبـة للجـين*sfa*و لـم يظهـر نفـس الجـين فـي اي عينـة إسـهال. وخلصـت الدراسـة إلـى أن الجـين *fim* كـان منتشـرا بكثـرة بـين مرضـىعدوى المسـالك البوليـة، وكـان الجـين *aer* عـالي الانتشـار بـين مرضـى الإسهال و وجدنا المضاد الحيويالاميكاسين هو المضاد الحيوي الأكثر فعالية.

TABLE OF CONTENTS

CHAPTER THREE

MATERIALS AND METHODS

CHAPTER FOUR
RESULTS

CHAPTER FIVE

DISCUSSION

CHAPTER SIX

Conclusion and Recommendations

LIST OF TABLE

LIST OF FIGURES

List of Abbreviations

Abbreviation	Complete word
DNA	Deoxyribonucleic Acid
UTIs	Urinary Tract Infections
UPEC	Uropathogenic *Escherichia coli*
fim	fimbriae type 1 gene
pap	pyelonephritis associated pili gene
sfa	S-family adhesions gene
aer	aerobactin gene
hly	hemolysin gene
PCR	Polymerase chain reaction
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
GUD	Beta-D-glucuronidase
UV	Ultraviolet light