



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

التحري الجزيئي عن بعض جينات عوامل الضراوة لبكتريا *Proteus mirabilis* متعددة المقاومة ودراسة التأثير النانوي على التعبير الجيني لبعض جينات الإنشغال

اطروحة مقدمة إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة بجامعة ديالى جزءا من متطلبات نيل درجة

دكتوراه فلسفة في علوم الحياة

من قبل

ابراهيم محمد عيسى الدليمي

بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2015

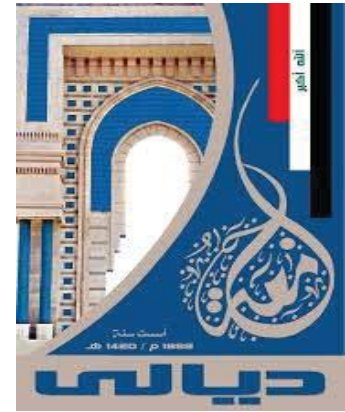
ماجستير علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2019

بإشراف

أ. د. هادي رحمن رشيد الطائي

أ. م. د. علي جعفر سليم الربيعي

Ministry of Higher Education and
Scientific Research
University of Diyala
College Education for pure Science
Department of Biology



**Molecular investigation of some virulence gene of
multidrug resistant in *Proteus mirabilis* isolated and
study of the Nano effect on gene expression for some
swarming gene .**

A Thesis

Submitted to the Council of the College of Education for Pure
Sciences, University of Diyala in partial Fulfillment of the
Requirements for the Degree of Doctorate of philosophy in Biology

by

Ibrahim Mohammed Essa AL-Dulaimy

B.Sc. Biology - College of Education for Pure Sciences 2016
M.Sc. Microbiology - College of Education for Pure Sciences
University of Diyala , 2019

By

Hadi Rahman Al-Taai
Prof. Dr

Ali Jaffar Saleem
Prof. Dr

1444 A.H

2023 A.D

1.1 المقدمة Introduction

تعتبر بكتريا المتقلبات *Proteus* احد افراد هذه العائلة المعوية حيث تمتاز بكونها عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام، لا هوائية اختيارية وغير مخمرة لسكر اللاكتوز، متحركة بشكل امواج لتكون ما يعرف بظاهرة الانثيال Swarming phenomena ولها اهمية كبيرة في إنتشار العدوى المكتسبة من المستشفيات مسببة الكثير من الاخماج والاصابات إذ تعتبر ممرضات انتهازية عند تواجدها في غير مكانها الطبيعي (Sun و اخرون , 2019 ; Bitar وآخرون، 2020).

يعتبر النوع *Proteus mirabilis* الاكثر شيوعاً بين افراد جنس المتقلبات فهو مسؤول عن 80-90% من الاصابات (Drzewiecka, 2016) اهمها التهابات المسالك البولية المعقدة وخاصة تلك المتعلقة بالقسطرة Catheter associated urinary tract infections(CAUTIs) او الناتجة عن خلل تشريحي Anatomical abnormalities بالمجرى البولي، كما ويعد احد مسببات اخماج المعدة والامعاء واخماج الجهاز التنفسي والتناسلي والجروح والحروق والتقيحات (Bunyan وآخرون، 2020).

تكون امراضية هذه البكتريا مرتبطة بامتلاكها العديد من عوامل الضراوة التي تساعدها على استعمار جسم المضيف وإحداث الإصابة منها الاسواط Flagella والخمل Fimbria وانتاج الأنزيمات كأنزيم اليوريز Urease والأنزيم الحال للدم Haemolysin والأنزيم الحال للبروتينين Protease والأنزيم الحال للدهون Lipase والبكتيروسين فضلاً عن تكوين الغشاء الحيوي Biofilm (Dougnon وآخرون، 2020) كما تتصف بانتاجها لأنزيمات البييتالاكتاميز β -Lactamase التي تعمل على تحويل جزيئة المضاد الحيوي قبل وصوله للهدف وبذلك تمنح البكتريا صفة المقاومة (Hasan وآخرون، 2021).

كان لاكتشاف المضادات الحيوية الأثر الكبير في انخفاض معدلات الإصابة وقد وجد ان الافراط في استعمال مضاد حيوي معين بشكل عشوائي وبدون أتباع نظام صحي يؤدي الى ظهور سلالات بكتيرية ذات مقاومة متعددة multidrug resistant وعادة ما تنتشر صفة المقاومة بشكل طردي مع الزيادة في استعمال هذه المضادات، الأمر الذي جعل علاج هذه الأمراض ينطوي على صعوبات كبيرة، لذا وجب اختيار المضاد الحيوي الملائم للعلاج وأن لا يتم عشوائياً وإنما يعتمد على إجراء اختبارات الحساسية الدوائية على الجرثومة المعزولة لمعرفة المضاد المناسب للقضاء عليها (Sedlakova وآخرون، 2014). ونتيجة لظهور المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية من قبل بكتريا

P. mirabilis استخدمت بدائل اخرى غير المضادات الحيوية للقضاء على هذه البكتريا كالمستخلصات النباتية و الدقائق النانوية (Nanoparticles) وهي مواد ذات احجام نانوية والتي تمتلك تأثيراً كبيراً على مكونات الخلية البكتيرية (Roy وآخرون, 2010) ومن هذه المواد النانوية هي أكاسيد الزنك و أكاسيد التيتانيوم والنحاس والكوبلت والفضة والذهب (Sathiyavimal و آخرون, 2018).

نظراً لانتشار الاخماج بين المرضى الراقدين والمراجعين من مختلف الاعمار ولكون التشخيص السريع والدقيق يعد خطوة مهمة في العلاج والشفاء فقد تم استعمال التقنيات الجزيئية الحديثة وان كانت ماتزال محدودة الاستعمال في دول العالم الثالث, إلا أنها وفرت أفضل الوسائل التشخيصية ومنها الاعتماد على الجين 16S rRNA والذي يعطي تشخيصاً على مستوى النوع باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction لما تمتاز به من الخصوصية والسرعة العالية للتحري عن سلالات بكتريا *P. mirabilis* في العينات السريرية، ولغرض زيادة امكانية التشخيص المتكامل والدقيق وبكلفة ووقت اقل وبذلك تعد من التقنيات الاكثر رواجاً في جميع انحاء العالم (Nazemi وآخرون، 2011).

بناءً على ما تقدم أُجريت الدراسة الحالية لتحقيق الهدف التالي :

التحري الجزيئي لجينات عوامل الضراوة لبكتريا *Proteus mirabilis* ذات المقاومة المتعددة ودراسة التأثير النانوي على التعبير الجيني لبعض جينات الانثيال , ويمكن تحقيق الهدف من خلال الخطوات التالية :

1. عزل وتشخيص بكتريا *Proteus mirabilis* من مصادر سريرية مختلفة
2. الكشف عن مقاومة العزلات للمضادات الحيوية شائعة الاستخدام
3. الكشف المظهري عن النصاب الحسي وبعض عوامل الضراوة
4. التحري الجزيئي عن بعض جينات الضراوة , *fliA*, *fliC*, *mrpA*, *wosA*, *rsbA* والمقاومة للمضادات الحيوية *bla_{CTXM2}*, *Ia*(3)*acc*, *Ib*(6)*acc* للعزلات قيد الدراسة
5. تقدير التعبير الجيني لبعض جينات الانثيال بوجود اوكسيد الزنك النانوي ودقائق الفضة النانويه

Abstract

Collected of 250 samples from different clinical sources (urinary tract infections, wounds, discharge and burns) at Baqubah General Hospital and Al-Batoul Maternity and Children's Hospital in Baqubah City for the period from October 2020 to March 2021 to investigate the bacteria *Proteus* proprific of both sexes. The percentage of male patients constituted 44% and female patients 56% aged between (one month - 40 years), distributed by 72% for inpatient patients and 28% for non-inpatient patients. Makonky agar medium and Blood agar medium were used to grow the samples and after their growth they were diagnosed using microscopy and bioquantitative tests, then the Compact VITEK2 device was used to confirm the diagnosis. Fifty eighty isolates were isolated from bacteria *Proteus. spp* included 50 isolates belonging to the type *Proteus mirabilis* and 8 isolates of the type *Proteus vulgaris*, the isolates of *P. mirabilis* bacteria were divided according to the location of infection, as the highest percentage of isolation from diuresis was 84%. The results showed that there were no significant differences in the rates of infection with these bacteria in terms of sex and age, as they constituted 56% for females and 44% for males, and the highest rate of infection was in the age group (40-20) years.

Allergy screening test was performed for 50 isolates towards 14 antibiotic using the Kirby-Bauer method, the isolates showed the highest resistance to 100% for Doxycycline, 88% for Cefepim, 84% for Amoxicillin-Clavulanic acid, 80% for Cefotaxime and Azthromycin, 78% for trimethoprim, 60% for Gentamycin antagonist, 56% for Aztreonam, 32% for piperacycllin, and levofloxacin 24% for ciprofloxacin, , 16% for Meropenem, 10% for imipenem and amikacin.

Phenotypic detection was conducted for some virulence factors, including the ability of bacteria to move the wave and flagella and their ability to produce the enzyme urease and their ability to adhere and the percentage was 100%, and it was also revealed that they were able to produce the biofilm in a way by the method of tubes and the method of calibration dishes and were productive and by 70% and 76% respectively, and the ability of bacteria to possess the sensory quorum Acyl-Homserine Lactone was investigated, where it was 45 (90%), while 5 isolates do not have the sensory quorum and its source is diuresis and exit.

Abstract

DNA was extracted for 20 isolates of *P. mirabilis*. To detect some virulence genes and some resistance genes, the virulence genes included the flagella genes *flaA* and *fliC*, the gene forming the *mrpA*, the swarming genes *rsbA* and *wosA*, using PCR chain reaction. The results showed the presence of the genes *flaA*, *fliC*, *rsbA*, *wosA* and *mrpA* in all isolates by 100%, while the antibiotic resistance genes *aac(6) Ib-cr*, *aac(3)Ia* and *bla_{CTXM2}* had a percentage of appearance in isolates 35%, 20% and 100% respectively.

The results of the sequencing of the amplification products of the *rsbA* and *wosA* genes of two isolates of *P. mirabilis* (11,12) with the sequence of standard isolates recorded at the International Bioinformatics Center (NCBI) showed complete similarities (100%) for the *rsbA* gene and 99% similarity for *wosA* between the sequences of special samples of sequencing experiments with the expected target covering part of the *wosA* and *rsbA* genes in bacteria *Proteus mirabilis*. These isolates were registered in the World Gene Bank and specialized bank codes were obtained for both isolates and the genetic code ON944189 and the genetic code ON944190 were registered to represent both the isolation S1 and the S2 isolation of the *wosA* gene, and the genetic code ON944191 and the genetic code ON944192 which were registered to represent both the isolation S1 and the S2 isolation of the *rsbA* gene.

The results of the test of the effect of silver and zinc oxide nanoparticles on the expression of the *rsbA* and *wosA* genes responsible for the phenomenon of swarming showed a decrease in gene expression for isolates after treatment with silver nanoparticles compared pre-treatment gene expression was 1 before treatment and 0.44 after treatment for the *rsbA* gene, and 1 before and 0.76 after treatment with silver nanoparticles.

The results of gene expression after treatment with zinc oxide nanoparticles showed decrease the gene expression of gene *rsbA* and *wosA*, where reached 0.49 after treatment for the *rsbA* gene and 0.52 after treatment for the *wosA* gene.