Agriculture College – Wasit University

Dijlah Journal of Agricultural Sciences

ISSN 2790 – 5985
eISSN 2790 – 5993

Dijlah J. Agric. Sci., 2(3): 15-26, 2024

Effect of sterilizing feed with different concentrations of ozone gas on some hematological and biochemical characteristics of broiler chickens

Monther Nouman Al-Azzawi [1], Methal Kareem Abbas [2]

[1,2]College of Education - Al-Qadisiyah University – Iraq.

***Corresponding* author e-mail**: mndhrnmanbdalwahdhswnalzawy@gmail.com

Abstract:

P*roteus* mirabilis bacteria is considered one of the species capable of causing various types of human infections, including those of the wounds, ear, gastrointestinal tract, and urinary tract. It causes different clinical diseases, including urinary tract infections (UTIs) and wound infections. The aim of the study was to investigate *P. mirabilis* isolates and diagnose them morphologically or genetically through clinical cases and to examine the virulence factor, urease. The results showed the isolation of 20 P. mirabilis strains from 501 urine samples, middle ear infections, and skin infections. These were distributed as follows: 10 isolates (60%) from urine samples, 5 isolates (20%) equally distributed between middle ear infections and skin infections, all collected from various hospitals. The urease enzyme was genetically examined by detecting the ureC gene responsible for the diagnostic traits in *P. mirabilis*. Eighteen out of the 20 isolates produced the ureC gene, a 100% detection rate. The study used a specific primer for the urease-producing enzyme gene, and after applying polymerase chain reaction (PCR) on all isolates and electrically migrating them, the result showed that 18 isolates produced the urease enzyme gene. The genetic bands appeared at a single molecular size of 317 base pairs (bp).

Keywords: P. mirabilis, urease enzyme, polymerase chain reaction (PCR), urinary tract.

وراثيا والتحري عن انزيم اليوريز لحالات سرسرية مختلفة *Proteas mirabilis* عزل وتشخيص بكتيريا

منذر نعمان العزاوي[1] ، ميثال كريم عباس[2]

قسم علوم الحياة – كلية التربية – جامعة القادسية / العراق

الخلاصة

تعتبر بكتريا Proteas mirabilis احد الانواع التي لها القدرة على التسبب بمجاميع مختلفة من العدوى البشرية، بما في ذلك الجروح والأذن والجهاز الهضمي والمسالك البولية، ويسبب أمراضاً سريرية مختلفة بما في ذلك التهابات المسالك البولية (عدوى المسالك البولية)، والتهابات الجروح. الهدف من الدراسة التحري مظهرياً او وراثياً من خلال عزل وتشخيص بكتريا P. mirabili من خلال حالات سريرية مختلفة و التحري عن عامل الضراوة اليوريز. اظهرت النتائج الحصول على 20 من عزلات P. mirabilis من 501 عينة بول والتهابات الاذن الوسطى والتهابات الجلد موزعة على (10) عزلات لعينات البول بنسبة (60%) تليها (5) عزلات بنسبة (20%) موزعة بالتساوي على التهابات الاذن الوسطى والتهابات الجلد تم جمعها من مستشفيات مختلفة. تم التحري جزيئيا عن انزيم اليوريز من خلال ظهور جين ureC المسؤول عن الصفات التشخيصية في بكتريا P.mirabilis حيث انتجت 18 عزلة جين ureC من مجموع 20 عزلة وبنسبة (100%).من خلال استعمال بادئ خاص بجين انتاج أنزيم اليوريز بعد تطبيق تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل على جميع العزلات وترحيلها كهربائياً فكانت النتيجة 18 عزلة انتجت جين أنزيم اليوريزمن مجموع 20 عزلة وظهور حزم وراثية بمستوى واحد و بحجم جزيئي واحد هو (bp317).

الكلمات المفتاحية : *P.mirabilis*، أنزيم اليوريز، البلمرة المتسلسل، المسالك البولية

المقدمة

تنتمي المتقلبة الرائعة إلى عائلة البكتيريا المعوية Enterobacteriaceae ويمكن أن تسبب أمراضًا سريرية مختلفة بما في ذلك التهاب المسالك البولية، والتهاب الجروح، والتهاب السحايا عند الرضع، والتهاب الشغاف، وتسمم الدم، لأنها تنتج العديد من عوامل الضراوة بما في ذلك (الالتصاق، السموم، الأسواط، الغشاء الحيوي، الهيمولايسين، الإنزيمات) (Slattery et al., 2020).وتتميز عن بقية أفراد العائلة بإنتاجها لأنزيم Deaminase Phenylalanine (Levinson et al., 2016). بكتيريا P. mirabilisأحد العوامل المسببة الأكثر شيوعًا لعدوى المسالك البولية، خاصة في مرضى القسطرة (Schaffer et al., 2017). بالإضافة إلى ارتباطها بالتهابات الجهاز الرئوي الانتهازية والحروق والجروح والجلد والعينين والأنف والأذنين والتهاب المعدة والأمعاء، كما وجد أنها أكثر مسببات الأمراض البكتيرية انتشارًا والتي تسبب التهاب الأذن الوسطى (Liu Zhao et al., 2023).

إنزيم اليوريز هو عامل ضراوة مهم في عدوى P. mirabilis ، بشكل خاص (عدوى المسالك البولية). وهو إنزيم تنتجه البكتيريا التي تحفز التحلل المائي لليوريا، وهو منتج نفايات نيتروجينية موجود في البول، إلى الأمونيا (NH_3) وثاني أكسيد الكربون (CO_2) (Hasan et al., 2021). اليوريز مهم في تكوين P. mirabilis المرضي، الذي يحفز تكوين الحصوات في الكلى والمثانة أو يعيق المسالك البولية.(Armbruster et al., 2017)

يكمن الدور الرئيسي في التهابات المسالك البولية المرتبطة بالقسطرة (CAUTI) التي تسببها المتقلبة الرائعة في قدرة هذا العامل الممرض على إنتاج اليوريز، وهو إنزيم معدني والذي يحلل اليوريا إلى ثاني أكسيد الكربون والأمونيا (Schaffer et al., 2015). تشفر مجموعة جينات اليوريز (ureRDABCEFG) لإنزيم متعدد النيكل مال ميتالوإنزيم الذي يتحلل اليوريا إلى الأمونيا وثاني أكسيد الكربون، مما يرفع الأس الهيدروجيني، ويسبب ترسيب أيونات البول متعددة الوظائف، مما يؤدي إلى تكوين الحصوات. يعد تعديل الأس الهيدروجيني هذا أمرًا بالغ الأهمية أثناء استعمار قسطرة P. mirabilis ، لأنه يساعد على الالتصاق البكتيري وتكوين الأغشية الحيوية (Hasan et al., 2021). تمتلك معظم السلالات السريرية لـ P. mirabilis إنزيم اليوريز فعال للغاية، والذي يلعب دوراً هاماً في تكوين الأغشية الحيوية. يقوم الإنزيم بتكسير اليوريا في البول، مما يؤدي إلى إطلاق الأمونيا وزيادة في درجة الحموضة البولية. هذه العملية تؤدي إلى ترسيب المعادن التي توجد عادة في البول، وتشكل بلورات ستروفيت (مغنيسيوم الأمونيوم والفوسفات) وبلورات الهيدروكسي باتيت (فوسفات الكالسيوم). هذه البلورات تصبح جزءًا لا يتجزأ من الأغشية الحيوية المتنامية، وهي ظاهرة تعرف باسم التمعدن الحيوي لليوريا.(Gayani et al., 2021)

يبلغ وزن اليوريز 250 كيلو دالتون، والذي يتم تصنيعه في سيتوبلازم البكتيريا ويتم تنشيطه عند إدخال أيونات النيكل، وجينات اليوريا(UreA) ، 1 كيلو دالتون، واليوريز(UreB) ، 12 كيلو دالتون، واليوريك(UreC) ، 61 كيلو دالتون (Koper et al., 2004). في حين أن الجينات الملحقة، UreD)، 31 كيلو دالتونUreE) (، 18 كيلو دالتونUreF) (، 23 كيلو دالتونUreG) (، 22 كيلو دالتون(، تقوم بتشفير عديدات الببتيد اللازمة لإدخال أيونات النيكل في المركز المعدني الناتج. في اليوريز النشط تحفيزيًا، يحتوي UreC على المركز المعدني للنيكل، وUreD، وUreE، وUreF، و UreGهي بروتينات ثانوية تساهم في تجميع المركب النشط ووضع أيون النيكل في المركز المعدني، ويتم نسخ جين ureR في الاتجاه المعاكس لـ (Al ureDABCEFG Jazeera et al., 1995).

ولهذه الأسباب، هدفت الدراسة الحالية إلى التحري مظهريًا أو وراثيًا من خلال معرفة مدى مقاومتها للمضادات الحيوية بيتا لاكتام من المحاور التالية: عزل وتشخيص بكتيريا P. mirabilis من خلال حالات سريرية مختلفة والتحري عن عامل الضراوة اليوريز في البكتيريا.

المواد وطرائق العمل

تحضير الاوساط الزرعية الجاهزة Preparation of Cultures

تم تحضير هذه الوسائط في المختبر وفقا للمصنعين ، وتم تعديل التعليمات الخاصة بكل وسائط ودرجة الحموضة إلى 7.2 ± 0.2 ثم غليها في حمام مائي لضمان إذابة جميع المكونات تماما ، وتعقيم الوسائط عن طريق التعقيم عند 121 درجة مئوية 15 P رطل / بوصة 2 لمدة 15 دقيقة. تم تحضين الألواح والأنابيب التي تحتوي على وسائط مختلفة عند 37 درجة مئوية للتأكد من عدم وجود تلوث ثم تخزينها عند 4 درجات مئوية حتى الاستخدام.

تحضير الأوساط الزرعية المختلفة :

وسط أكار الدم Blood agar

تم تحضير قاعدة أجار الدم طبقاً لتعليمات الشركة المصنعة يتم تحضير التعليمات بإذابة 40 جم من وسط أجار الدم في 1000 مل من الماء الجاف. ثم يتم تعقيمها عند درجة حرارة 121 مئوية لمدة 15 دقيقة. وتبريده إلى 50 درجة مئوية. ثم يضاف (5%) من الدم البشري الطازج، ويخلط جيداً حتى يتجانس، ثم يسكب في أطباق بتري دش معقمة. يبرد أخيرا إلى 37 درجة مئوية ويترك ليتجمد في الغرفة درجة حرارة. تم استخدام هذا الوسط لزراعة العزلات البكتيرية وتحديد قدرة البكتيريا على انحلال خلايا الدم (Madigan et al.,2005).

وسط اكار اليوريا Urea Agar

تم تحضير محلول اليوريا المعقم بالترشيح (5 مل) مع مرشح ميليبور 0.20 ميكروميتر، عن طريق إذابة 2 جم من اليوريا في (5 مل) من D.W. بعد التعقيم، يضاف إلى 95 مل من قاعدة أجار اليوريا، ويوضع في أنابيب معقمة. وأخيراً، يتم تبريده إلى 37 درجة مئوية ويترك في درجة حرارة الغرفة ليصلب في شكل مائل لاستخدامه

وسط ماء الببتون Peptone water medium

تم تحضير هذا الوسط بإذابة 20 جم من الببتون و 5 جم من كلوريد الصوديوم في كميةD.W ، وتم ضبط الرقم الهيدروجيني إلى (7.2)، ومن ثم باستخدام D.W اكتمل الحجم إلى 1000 مل، ثم تم تعقيمه بواسطة الأوتوكليف، ونقلها إلى أنابيب معقمة بسعة 5 مل وتخزينها في 4 درجات مئوية تم استخدامه لإظهار قدرة البكتيريا على تحلل الأحماض الأمينية التربتوفان إلى الإندول (1996 Collee et al.,).

اختبار الحركة Motility test

تم تحضيره بإذابة (0.8) غم من المرق المغذي و (10) غم من الاكار إلى (90) مل من D.W. تم ضبط الرقم الهيدروجيني إلى 7.0 وأكمل الحجم إلى (100) مل، وتم تعقيمه بواسطة التعقيم عند 121 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة. وتركها تتصلب كمائل عمودي. تم استخدامه لتحديد البكتيريا المتحركة وغير المتحركة (Goldman and Lorrence et al., 2009).

تحديد هوية العزلة Isolation identification

تم التعرف على البكتيريا المعزولة بناءً على الاختبارات المورفولوجية والكيميائية الحيوية ونظام Vitek2 لبعض العزلات.

طريقة صبغة كرام Gram stain method

إعداد مسحة الشريحة Preparation of a slide smear

يتم استخدام حلقة التلقيح لنقل كمية قليلة من البكتيريا من المستعمرة حيث يتم توزيعها مع قطرة من المحلول الملحي العادي على شريحة نظيفة لتسهيل الحد الأدنى من نقل المستعمرة إلى شريحة الفحص. يمكن أن تكون الشريحة إما تجفيفها بالهواء أو تجفيفها بمساعدة الحرارة على لهب لطيف. الحرارة تساعد التصاق الخلية بالشريحة الزجاجية ويمنع فقدان الزرع بشكل كبير اثناء الغسل.(Tripathi and Sapra 2020)

صبغة غرام Gram staining

تتم إضافة Crystal violet فوق المزرعة الثابتة. بعد مرور 10 إلى 60 ثانية يتم استخدام محلول اليود لتغطية المسحة لمدة 10 إلى 60 ثانية ويتم غسل الشريحة بالماء الجاري تتم إضافة بضع قطرات من مزيل اللون إلى الشريحة. غالبًا ما تكون مزيلات اللون هي مذيب مختلط من الإيثانول والأسيتون. تُعرف هذه الخطوة باسم "المعالجة بالمذيبات". يتم غسل الشريحة بالماء خلال 5 ثواني ..(O'Toole 2016) تتم مقاومة المسحة بمحلول الفوكسين الأساسي لمدة 40 إلى 60 ثانية. يُغسل محلول الفوكسين بالماء ويُزلق ويُجفف بالهواء بعد التخلص من الماء الزائد.

الفحص المجهري للشريحة Microscopic examination

يجب أن تخضع الشريحة للفحص تحت المجهر وفي غمرة الزيت .يجب أن يستخدم فحص الشرائح الأولي بقوة X40 والتاكيدعلى توزيع المسحة، ومن ثم ينبغي فحصها باستخدام القوةX100بعد غمرهابالزيت. (Tripathi and Sapra 2020).

المرضىPatients

تم جمع 25 عينة لحالات مرضية مختلفة شملت(بول من مرضى التهاب المسالك البولية, جرح التهاب الاذن الوسطى, الجلد) من مستشفيات مختلفة ومن مختلف الاعمار خلال مراجعتهم للمستشفيات خلال الفترة من 15اغسطس2023 ولغاية 15 نوفمبر2023.حيث تم تسجيل اسم كل مريض وعمره وجنسه. والحالة السرسرية الاساسية وتاريخ جمع العينات.

تشخيص العزلات البكتيرية بنظام2-Vitek Bacterial Identification

في الآونة الأخيرة، تم استخدام هذا النظام لتحديد الكائنات الحية الدقيقة (Winn *et al*.,2005). وقد تم تزويده بقاعدة بيانات التعريف المطلوبة لجميع اختبارات التعريف الروتينية التي وفرت كفاءة محسنة في التشخيص الميكروبي مما أدى إلى تقليل الوقت والحاجة إلى إجراء أي اختبارات إضافية، والتي ستكون آمنة لمستخدم النظام. تم تنفيذ هذا النظام وفقًا لتعليمات الشركة المصنعة (Biomerieux France).وكان هذا النظام يتكون من:

1- جهاز كمبيوتر شخصي.

2- القارئ / الحاضنة التي تتكون من مكونات داخلية متعددة بما في ذلك: كاسيت البطاقة ، وآلية حشو البطاقة ، وآلية معالجة تحميل الكاسيت ، وسدادة البطاقة ، وقارئ الباركود ، ودائري الكاسيت ، والحاضنة.

3-يحتوي النظام أيضا على: بصريات النفاذية ، ومعالجة النفايات ، وإلكترونيات التحكم في الأدوات والأدوات الثابتة. تم تنفيذ هذا النظام وفقا لتعليمات الشركة المصنعة (BiomerieuxFrance) على النحو التالي:

ا- تم وضع ثلاثة مل من المحلول الملحي العادي في أنبوب اختبارو تلقيح مع حلقة كاملة من مستعمرة واحدة في المزرعة ليلا.

ب- تم إدخال أنبوب الاختبار في آلة فحص adens لتوحيد المستعمرة إلى محلول McFarland القياسي = (1.5×108 خلية / مل).

ج- تم وضع اللقاحات الموحدة في الكاسيت.

د- ثم تم إدخال رقم تعريف العينة في برامج الكمبيوتر عن طريق الباركود. ثم كانت بطاقةVitek-2 متصلة برقم معرف العينة.

ه- تم وضع الكاسيت في وحدة الحشو ، عندما تم ملء البطاقات ، تم نقل الكاسيت إلى وحدة القارئ / الحاضنة.

حفظ وصيانة العزلات البكتيريةPreservation and maintenance of bacterial isolates

تم الحفاظ على العزلات البكتيرية على أجار مائل للمغذيات عند 4 درجة مئوية. تم الحفاظ على العزلات شهريا عن طريق إعادة الاستزراع على وسط جديد. تم استخدام مرق المغذيات المكمل ب 15٪ من الجلسرين للحفظ الطويل وتم الحفاظ على العزلات مجمدة عند -20 درجة مئوية (تجميد) لعدة أشهر (صيانة طويلة الامد) (Forbes *et al*.,2007).

إعداد اللقاح البكتيري Preparation of bacterial inoculum

تم تعليق ما لا يقل عن 3-5 مستعمرات معزولة جيدا في ضخ قلب الدماغ 4-5 مل. تم تحضين ثقافة المرق عند 37 درجة مئوية لمدة 8 ساعات. تم تعديل تعكر مزرعة المرق النشطة النمو باستخدام مرق معقم للحصول على تعكر يمكن مقارنته بصريا بأنبوب معايير McFarland 0.5 (نمو يعادل1.5×108 خلية / مل).

التحليل داخل السيليكو لتسلسل عوامل الضراوةIn-silico analysis of virulence gene sequence

بعد تلقي تسلسل الحمض النووي لجينات الفوعة من الشركة ، تم تطبيق الخطوات التالية في السيليكو لتحديد تسلسل الأحماض الأمينية لبروتين الغشاء الخارجي (flaA و ureC وZapA) من العزلات المحلية وكذلك للكشف عن أي تغيرات ظهرت في هذه البروتينات من خلال مقارنتها مع العزلات القياسية من NCBI ، ثم تحديد نوع تعدد الأشكال وتأثيره على البروتينات.

1- يستخدم برنامج Finch TV لقراءة تسلسل الجينات من أجل التحقق من لحاف التسلسلات وتحرير التسلسلات عن طريق تقليم تسلسلات rubsh.

2- يستخدم برنامج CAP3 لتجميع التسلسلات الأمامية والعكسية للجينات (Huang and Madan، 1999).

3- برنامج إطار القراءة المفتوح (ORF) من NCBI يستخدم لتحويل تسلسلات النيوكليوتيدات إلى تسلسلات الأحماض الأمينية.

4- يستخدم برنامج blastp (بروتين البروتين BLAST) من NCBI لاختبار هوية بروتينات العزلات المحلية ذات السلالات القياسية العالمية وتحديد تعدد الأشكال.

5- يستخدم برنامج Clustal Omega من EMBL-EBI لعمل محاذاة تسلسلية متعددة لبروتينات الغشاء الخارجي للعزلات المحلية مقابل بروتينات الغشاء الخارجي للسلالات القياسية ثم يستخدم برنامج Jalview لرؤية محاذاة التسلسل المتعدد

6- تم استخدام برنامج MEGAX لرسم شجرة النشوء والتطور لبروتينات الغشاء الخارجي وتقييم المسافة الجينية بين هذه البروتينات من العزلات المحلية والسلالات القياسية.

اختبار اليوريز

أجار اليوريا المعد سابقا كما في (2-2-3-2). من خلال طريقة الطعن ، تم تلقيح مستعمرة واحدة من ثقافة جديدة ذات حلقة معقمة واستزراعها لمدة 24 ساعة عند 37 درجة مئوية. تظهر نتيجة إيجابية من خلال نمو اللون الوردي ، في حين يشار إلى نتيجة سلبية من خلال تطور اللون الأصفر. تم إجراء هذا الاختبار لمعرفة ما إذا كانت البكتيريا يمكن أن تخلق إنزيم اليورياز ، الذي يكسر اليوريا إلى أمونيا وثاني أكسيد الكربون (Goldman and Lorrence *et al*., 2009).

التحليل الاحصائي Statistical analysis

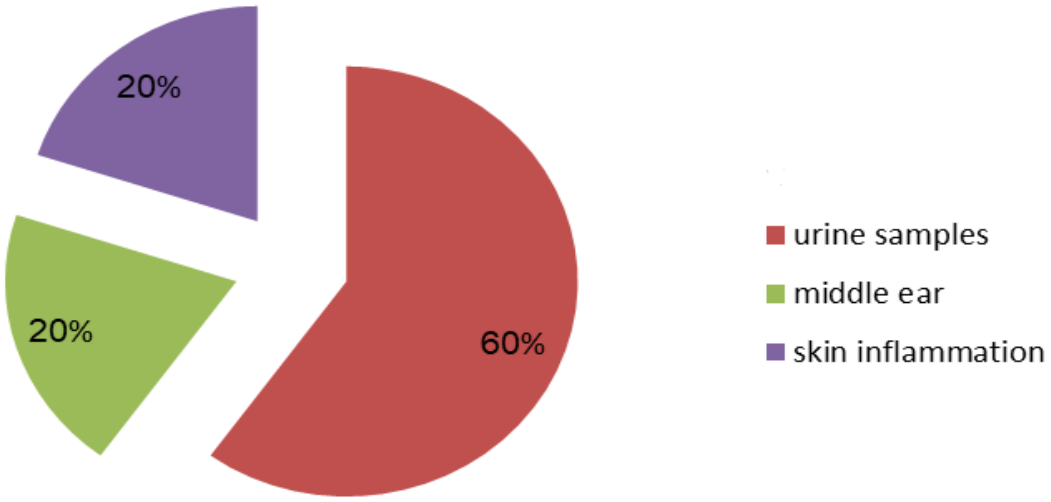
تم إجراء الاستقصاء الإحصائي باستخدام حزمة البرامج الإحصائية (IBM, SPSS V.23). تم تعريف البيانات إحصائيا في ترتيب التكرارات (عدد الحالات) والتكرارات النسبية (النسب المئوية). تم حساب ارتباط بيرسون الأقل أهمية عند $p< 0.01$ و$p< 0.05$.

النتائج والمناقشة

العزل و التشخيص المظهري لبكتريا *P.mirabilis*

تم الحصول على 20 من عزلات Proteus mirabilis من 150 عينة بول والتهابات الاذن الوسطى والتهابات الجلد موزعة على (10)عزلات لعينات البول بنسبة (60%) تليها(5)عزلات بنسبة (20%) موزعة بالتساوي على التهابات الاذن الوسطى والتهابات الجلد تم جمعها من مستشفيات مختلفة بين الفترة سبتمبر 2023 ويناير 2024. تم زرع جميع العينات في مرق المغذيات

عند 37 درجة مئوية لمدة 18-24 ساعة ، ثم تم زراعتها على أكار الدم وأكار MacConkey عن طريق طريقة لوحة الخطوط لملاحظة مورفولوجيا المستعمرة (اللون والشكل وملمس السطح والحافة والحجم والارتفاع ، إلخ). تم تحديد *P mirabilis*. عن طريق الاختبارات الكيموحيوية ونظام VITEK 2 المدمج. تم توضيح النسبة المئوية للعزل لكل عينة من إجمالي العزلات البكتيرية كما في الشكل (1-4):



الشكل (1): يمثل الرسم البياني العدد الإجمالي للعينات السريرية في بكتريا P.mirabilis

كان هناك 20 (13٪) عزلة تنتمي إلى *P. mirabilis* من أصل 150 نمو بكتيري و 130 (87٪) عينة سلبية ل P. mirabilis. هذه النتيجة لا تتفق ما تم التوصل إليه.(Abed et al., 2021) أظهرت النتائج أن الجروح المصابة بنسبة (18٪) *P. mirabilis* كانت أكثر شيوعا من عينة البول والأذن ، قد تكون هذه الاختلافات في النسبة المئوية بين عدوى الجروح والعدوى الأخرى (التهاب المسالك البولية والتهاب الأذن الوسطى) بسبب الحساسية العالية للمنطقة المكشوفة من الجرح للغزو الميكروبي ، سواء كان الجرح عفويا أو ناتجا عن عملية جراحية. تماما كما تصبح الجروح أكثر عرضة للعدوى من خلال عدم اتباع الطرق الصحيحة من حيث النظافة وعدم الاهتمام بقواعد التعقيم من قبل موظفي المستشفى ، وكذلك العوامل الأخرى المتعلقة بالنظافة الشخصية للمريض نفسه والطاقم الطبي (Alabdeen and Ahmed 2021). يعتبر *P.mirabilis* من مسببات الأمراض الانتهازية ، مما يعني أنه يمكن أن يسبب العدوى عندما يكون هناك خرق في دفاعات الجسم الطبيعية الجروح هي موقع شائع لمثل هذه الانتهاكات ، لأنها تخلق فتحة للبكتيريا لدخول الجسم (Lok et al., 2013). تتقارب هذه النتيجة مع نتائج (Owaied and Jabur, 2022) الذين أظهروا (15٪) معزولة من عينات الجروح. وجدت الدراسات المحلية التي أجراها من ديالى ، معدلات أعلى لعزل *P. mirabilis* من عينات الجروح والتي كانت 36٪ و 24٪ على التوالي. فيما يتعلق بعينات البول ، فإن نسبة عزلات *P. mirabilis* التي ظهرت في هذه الدراسة هي 8 (8٪) من إجمالي 150 عينة من عينات البول ، وتتوافق هذه النتيجة مع نتائج (Owaied and Jabur 2022). الذين أظهروا (6.0٪) معزولة من عينات البول. تم تصميم المسالك البولية للتخلص من النفايات والمواد الغريبة من خلال إنتاج البول وطرده. يساعد إجراء التنظيف المستمر هذا على تقليل خطر الإصابة بالعدوى عن طريق طرد البكتيريا قد يكون السبب دور الجهاز المناعي الفطري في التهاب الأذن الوسطى ، وتحديدا دور الخلايا الظهارية للأذن الوسطى ، الخلايا العدلة، البلعمية ، الخلايا الليفية ، الخلايا البدينة . كما تحمي الخلايا القاتلة الطبيعية الأذن الوسطى من مسببات الأمراض (Mittal et al., 2014). وكذلك الأذن لديها هياكل تشريحية متميزة ، بما في ذلك قناة الأذن والأذن الوسطى ، والتي هي محمية نسبيا من مسببات الأمراض الخارجية. تصطف قناة الأذن مع شمع الأذن الذي ينتج من الأذن التي تشكل حاجزا

فسيولوجيا بين البيئة الخارجية والقناة السمعية الخارجية العميقة ، ويعتقد أيضا أن التركيب الكيميائي للشمع له خصائص مضادة للبكتيريا والفطريات ، مما يمنع الأذن الخارجية من العدوى (Prasad and Mohan 2014). تحتوي الأذن على نباتات ميكروبية فريدة خاصة بها ، والتي تشمل الكائنات الحية التي تتكيف مع هذه البيئة المحددة.

الاختبارات الكيميوحيوية Biochemical tests of Proteus mirabilis

تم استخدام الاوساط المختلفة لعزل وتحديد *P.mirabilis* من أنواع Enterobacteriaceae الأخرى كأجراء يعتمد على الانواع الأكثر شيوعا على MacConkey agar ، أظهرت العزلات غير المخمرة للاكتوز كمستعمرات شاحبة ومحدبة ومستديرة وناعمة مع رائحة مميزة تشبه الأسماك (Betty et al.، 2007).بعد ذلك تم أجراء العديد من الأختبارات الكيميوحيوية التقليدية لمعرفة خصاص البكتريا. تم اختبار جميع عزلات البكتريا فأعطت نتيجة موجبة للكاتاليز(Catalase) واليوريز(Urease) والحركة (Motility) ,وتم أجراء أختبارالأوكسيديز(Oxidase) حيث أعطى الاختبار نتيجة سالبة, كذلك تم إخضاع جميع العزلات لاختبارIMVIC حيث أظهرت نتائج سالبة لفحص(Indol) وموجبة لاختبار(Methyle red) وسالبة لفحص فوكس-بر وسكار(Voges-Proskauer (VP) ,في حين أظهرت نتيجة موجبة لاختبار السترات (Citrate).جدول (1).

تمت مقارنة نتائج الاختبارات الكيميوحيوية مع خصائص Proteus spp. التي وثقها الذين أظهروا أنه تم تحديد *P.mirabilis* .ومزيد من الاختبارات التأكيدية للتشخيص للتمييز بين خصائص *P.mirabilis* باستخدام اختبار Urease ، الذي يظهر إيجابيا لليوريز واختبار الإندول الذي عادة ما يكون سلبيا للإندول (Levinson، Schwartz 2022).كذلك تمت مقارنة النتائج مع دراسة Fanar (2022)،حيث أعطت نتيجة موجبة لفحص Catalase وسالبة Oxidase، وعند اجراء اختبارات IMVIC فقد اعطت العزلات البكتيرية نتيجة سالبة لفحص Indol وموجبة لفحص Methyle red وسالبة لاختبار Vogas-Proskaur وموجبة لفحص Citrate utilization حيث يوصف مصدر وحيد للكاربون حيث تغيير الوسط من الاخضر الى الازرق نتيجة تغيير لون البروموثايمول الى اللون الازرق لزيادة الاس الهيدروجيني.وتتفق أيضا مع Kamil and Jarjes (2020).الذين أوجدا البكتريا في التهابات المسالك البولية.

جدول (1): الخواص البكتريولوجية والكيميوحيوية *p.mirabilis*

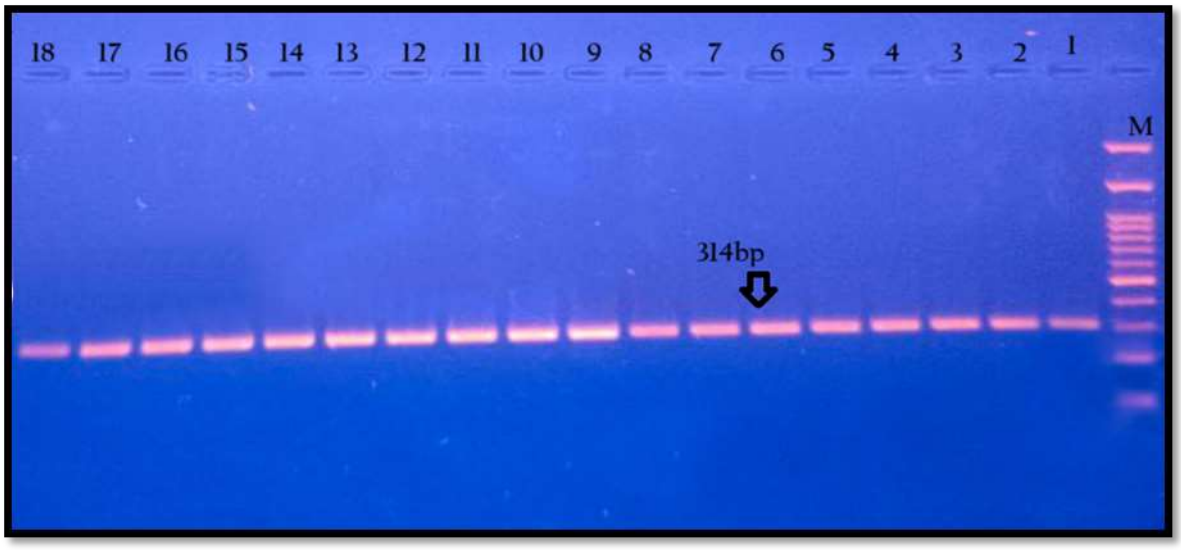
ت	الاختبار	النتيجة
1	صبغة كرام	-
2	الكاتاليز	+
3	الأوكسيديز	-
4	الاندول	-
5	المثيل الاحمر	+
6	فوكس-بروسكار	-
7	السترات	+
8	اليوريز	+
9	الحركة	+

+: دلالة إيجابية النتيجة, - : دلالة سالبة النتيجة.

اليوريز Protease Produce

تم التحري جزيئيا عن انزيم اليوريز من خلال ظهور جين ureC المسؤول عن الصفات التشخيصية في بكتريا *P.mirabilis* حيث انتجت 18 عزلة جين ureC من مجموع 20 عزلة وبنسبة (100%).من خلال استعمال بادئ خاص بجين انتاج أنزيم اليوريز بعد تطبيق تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل على جميع العزلات وترحيلها كهربائياً فكانت النتيجة 18 عزلة انتجت جين أنزيم اليوريزمن مجموع 20 عزلة وظهور حزم وراثية بمستوى واحد و بحجم جزيئي واحد هو (317bp). كما في الشكل (4-7) و الجدول (4-5). تتقارب هذه النتائج مع (Al-Mayahi,2017) و(Ali, 2015) الذي وجدوا أن جميع عزلات *P.mirabilis* كانت تنتج من اليوريز بنسبة 100٪ وان جميع عزلات *P. miribalis* منتجة للأنزيم بنسبة (100%) اذ كان معدل انتاج اليوريز للعزلات البكتيرية السريرية (100%) Fanar (2022)، والذي يعد من أهم العوامل في إمراضيه هذه البكتريا (Sahu *et al*.,2019) حيث اظهرت نتائج أنتاج انزيم البروتيز في دراستهم بنسبة 45%،ولا تتوافق أيضا مع دراسة(Fadhela *et al*.,2023) حيث كانت نسبة أنتاج أنزيم اليوريز (76.9%). اليوريز هو عنصر أساسي في التسبب في *P. mirabilis* ويمكن إنتاجه بكميات كبيرة ، حيث يقوم بتحليل اليوريا الى أمونيا ورفع تركيز اليوريا.(Schaffer *et al*.,2017). أ نزيم *P. mirabilis* urease نشط إلى حد أكبر من إنزيم اليوريز الناتج عن البكتيريا الأخرى. يعمل عن طريق تعديل درجة الحموضة إلى القاعدية، مما يؤدي إلى تراكم فوسفات الكالسيوم والمغنيسيوم في الغشاء الحيوي المتكون، مما يؤدي إلى تطوير الغشاء الحيوي البلوري، وهو النوع الأكثر تعقيدا من الأغشية الحيوية لأنه يعمل على إغلاق القسطرة البولية وحماية البكتيريا من المضادات الحيوية، مما يؤدي إلى فشل العلاج. غالبا ما يرتبط إنتاج اليوريز بالقدرة على العيش والازدهار في بيئات محددة. ureC هو المكون الرئيسي المسؤول عن إنتاج اليوريز في *P. mirabilis* . (Fadhela *et al*.,2023).

اليوريز هو أهم إنزيم لتشكيل حصوات الكلى والمثانة في عدوى المتقلبة الرائعة. تعتبر جينات ureA و ureB و ureC و ureD و ureE و ureF و ureG و ureR على ure operon مسؤولة عن عملية إنتاج إنزيم اليوريز. وأشارت الدراسة السابقة إلى ureC كجين رئيسي ومسبب لإنتاج اليوريز(Li *et al*.,2002)



الشكل (4-9): الترحيل الكهربائي لهلام الأغاروز الناتج من تفاعل PCR المتسلسل التي تم الحصول عليها باستخدام برايمر خاص بجين ureC. تمثل الممرات 1-18 جين ureC الناتج بحجم(314bp) ، ويمثل M خيط الحامض النووي(100bp).

جدول (2) النسبة المئوية لهوية تسلسل التماثل NCBI-BLAST بين عزلات IQD- Proteus mirabilis IQD-No.1 No.10 المحلية وعزل Proteus mirabilis المرتبط وراثيا NCBI-BLAST:

Trichomonas vaginalis isolate	Accession number	Homology sequence identity (%)			
		Identical NCBI isolate	Accession number	Country	Identity (%)
IQD-No.1	PP473987	*Proteus mirabilis*	KP313051.1	India	99.65%
IQD-No.2	PP473983	*Proteus mirabilis*	EU411047.1	India	99.75%
IQD-No.3	PP473986	*Proteus mirabilis*	OQ821323.1	Bangladesh	99.80%
IQD-No.4	PP473985	*Proteus mirabilis*	ON430654.1	China	99.65%
IQD-No.5	PP473981	*Proteus mirabilis*	MT276310.1	China	99.80%
IQD-No.6	PP473980	*Proteus mirabilis*	OP999709.1	India	99.65%
IQD-No.7	PP473979	*Proteus mirabilis*	OR964982.1	China	99.80%
IQD-No.8	PP473978	*Proteus mirabilis*	MT276310.1	China	99.80%
IQD-No.9	PP473984	*Proteus mirabilis*	OP999709.1	India	99.65%
IQD-No.10	PP473982	*Proteus mirabilis*	OR964982.1	China	99.80%

جدول رقم (3): العزلات الطافرة

Isolate number	**Original base**	**Mutant**	**Type of mutant**
PP473981	C	C-G	Transvesion
PP473984	G C	G-C C-G	Transvesion Transvesion

أظهرت النتائج أعلاه أنواعا متعددة من الطفرات كما هو موضح في الجدول (3). بالنسبة للعزلات (PP473981) ، كشفت طفرات النقل (C-G). بينما عزلة PP473984 أظهرت نوعين من الطفرات (G-C، C-G). حيث سلالة أخرى لم يكن لها اختلاف. لأن جين 16s rRNAعادة ما يكون أقل حدوث للطفرات ، بحيث تغير هذه الطفرات خصوصية جين البكتريا كما هو موضح في شجرة النشوء والتطور. ومع ذلك ، كانت العزلات (99.65-99.80) مماثلة للسلالة الدولية.

الاستنتاجات

من خلال الدراسة نستنتج ان تم الحصول على 20 من عزلات Proteus mirabilis من 501 عينة بول والتهابات الاذن الوسطى والتهابات الجلد موزعة على (10)عزلات لعينات البول بنسبة (60%) تليها(5)عزلات بنسبة (20%) موزعة بالتساوي على التهابات الاذن الوسطى والتهابات الجلد تم جمعها من مستشفيات مختلفة. كشفت نتائج الدراسة تم التحري جزيئيا عن انزيم اليوريز من خلال ظهور جين ureC المسؤول عن الصفات التشخيصية في بكتريا P.mirabilis حيث انتجت 18 عزلة جين ureC من مجموع 20 عزلة وبنسبة (100%).من خلال استعمال بادئ خاص بجين انتاج أنزيم اليوريز بعد تطبيق تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل على جميع العزلات وترحيلها كهربائياً فكانت النتيجة 18 عزلة انتجت جين أنزيم اليوريزمن مجموع 20 عزلة وظهور حزم وراثية بمستوى واحد و بحجم جزيئي واحد هو (bp317).

References

1- Slattery, S., J. Tony Pembroke, J. G. Murnane and M. P. J. S. R. Ryan (2020). "Isolation, nucleotide sequencing and genomic comparison of a Novel SXT/R391 ICE mobile genetic element isolated from a municipal wastewater environment." 10(1): 1-10.

2- Levinson, W.(2010). Review of medical microbiology and immunology. 11th ed. New York: Lange, pp. 85-93.

3- Schaffer, J. N., M. M. J. U. t. i. M. p. Pearson and c. management (2017). "Proteus mirabilis and urinary tract infections." 383-433.

4- Liu, M., Li, D., Jia, W., Ma, J., & Zhao, X. (2023). Study of the molecular characteristics and homology of carbapenem-resistant Proteus mirabilis

5- Hasan, T. H.; Alasedi, K. K.; and Jaloob, A. A. (2021). Proteus Mirabilis Virulence Factors. International Journal of Pharmaceutical Research, 13(1).

6- Armbruster, C. E.; Prenovost, K.; Mobley, H. L. T. & Mody, L. (2017). How often do clinically diagnosed catheter-associated urinary tract infections in nursing home residents meet standardized criteria? J. Am. Geriatr. Soc .; 65:395–401.

7- Schaffer JN, Pearson MM. (2015). Proteus mirabilis and urinary tract infections. Microbiol Spectr 3:3. doi:10.1128/microbiolspec.UTI -0017-2013.

8- Gayani, B.; Dilhari, A.; Kottegoda, N.; Ratnaweera, D. R.; Weerasekera, M. M. (2021). Reduced Crystalline Biofilm Formation on Superhydrophobic Silicone Urinary Catheter Materials. ACS Omega. 6(17):11488-11496.

9- Madigan, M. and Martinko, J. (editors). (2005). Blood agar .Brock Biology of Microorganisms (11th ed.). Prentice Hall.

10- Collee, J. G.; Fraser, G. A.; Marmion, P.B.; Simmoms, A. (1996). Practical Medical Microbiology. (14th ed). Chrchill living-Stone, New York.

11- Goldman, E. and Green, L. (2009). Practical Handbook of Microbiology. 2nd ed. CRC Press, Taylor and Francis Group. London. New York. pp: 217-224.

12- Tripathi, N. and A. Sapra (2020). "Gram staining". Update. EC Pharmacol. Toxicol. 6, 865–877.

13- Winn, W.; Allen, S.; Janda, W.; Koneman, E.; Procop, G.; Schreckenberger, P. and G. Woods. (2006). Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.

14- Forbes, B.; Sahm, D. and weissfeld, A. (2007). Baily and scott's diagnostic microbiology. 12th .Ed. Texas. Mosby Elsevire. P. 334-339.

15- Huang X. and Madan A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly Isolated from clinical samples.

16- Goldman, E. and Green, L. (2009). Practical Handbook of Microbiology. 2nd ed. CRC Press, Taylor and Francis Group. London. New York. pp: 217-224.

17- Alabdeen, Z. and B. H. J. K. U. J.-S. S. Ahmed (2021). "Effect of Pomegranate Peel Extract on the Production of Some Enzymes in Proteus spp Isolated from Different Clinical Samples in Kirkuk city." 16(3): 1-11.

18- Los, F. C., T. M. Randis, R. V. Aroian and A. J. Ratner (2013). "Role of pore-forming toxins in bacterial infectious diseases." Microbiology and Molecular Biology Reviews 77(2): 173-207.

19- Owaied, H. and S. J. U. o. T.-Q. J. o. S. Jabur (2022). "Antibiotic susceptibility of P. mirabilis isolated from clinical samples in Thi-Qar province." 9(2): 38-45.

20- Mishu, N. J., S. Shamsuzzaman, H. Khaleduzzaman, M. A. J. A. o. C. Mittal, R., J. Kodiyan, R. Gerring, K. Mathee, J.-D. Li, M. h. Grati and X. Z. J. I. J. o. I. D. Liu (2014). "Role of innate immunity in the pathogenesis of otitis media." 29: 259-267

21- Prasad, S. and N. J. I. J. M. S. P. H. Mohan (2014). "Anti-microbial properties of human wax." 3(1): 96-99

22- Betty, A. F; Sahm D. F. and Weissfeld, A. S. (2007). Bailey and Scott`s Diagnostic microbiology. 12th.ed. Mosby, Inc., an affilinate of Elsevier Inc.

23- Fanar D,M.(2022). Animicrobial Effect of Four Medical Plant Extracts Against Bacterial Isolates From Skin Diseases.

24- Al-Mayahi, F. S. A. (2017). Phenotypic and Molecular detection of Virulence factors in Proteus mirabilis isolated from different clinical sources. Basrah Journal Veterinary Research. 16(1): 369-388.

25- Sahu, R.; Sahoo, R. K.; Prusty, S. K.; and Sahu, P. K. (2019). Urinary Tract Infection and its Management. Systematic Reviews in Pharmacy, 10(1), 42-48.

26- MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 363-3 R, Li Q, Wu Q. (Lu W, Qiu Q, Chen K, Zhao 2022). Distribution and Molecular Characterization of Functional Class 2 Integrons in Clinical Proteus mirabilis Isolates. Infect Drug Resist; 15:465-474.