Iraqi Journal of Biotechnology, 2014,Vol.13, No.2 , 35-47

Molecular detection of *Proteus mirabilis* using PCR technique among urinary tract infection patients

Munther Adnan[1] Ismail Hussein Aziz[2] Mahdi Saber Al-Deresawi[3]

[1]Msc student in Genetic Engineering and Biotechnology Institute / University of Baghdad
[2]Genetic Engineering and Biotechnology Institute / University of Baghdad
[3]Biology Department, College of Science, University of Wasit

Abstract: The study included isolation and diagnosis of bacteria *Proteus mirabilis* from patients suffering from urinary tract infection (UTI) with different types (simple and complicated cases) and from clinical urinary tract infected patients. Isolated of bacteria from (UTI) infected patients and from patient urinary tract catheter which was used in complicated cases and from defective urinary tract patients. Three hundred and ten (310) samples from (UTI) patients in different hospitals of Baghdad and Al-Kut. From period 1/1/2013 to 1/8/2013.

The results observe (218) positive isolates for bacteriological exam and by the biochemical tests and Api appear Proteus spp (17.88 %) and P. mirabilis (92.3%) but P. vulgaris(7.7) %.

PCR by used specific primer (16SrRNA) for detected genus Proteus and to differentiate it from other enterobacteria used (UreR) primer to detect the genome which was controlled for urease enzyme production. The results of primer UreR observe 36 isolates were positive.

Results of the Nitrogen bases sequence of the PCR technology of the samples in this study revealed consistency reaching up to 98 % with the Nitrogen bases sequence of the UreR gene present in the P. mirabilis strain of the WHO. This study presented high specificity and sensitivity for the diagnosis of P. mirabilis using the PCR technology which is cheaper and faster than the conventional methods currently used in the hospitals and laboratories.

Key word: Proteus mirabilis, urinary, 16srRNA.

التشخيص الجزيئي لبكتيريا *Proteus mirabilis* باستخدام تقنية التفاعل السلسلي البلمري بين المرضى المصابين بالتهاب المسالك البولية

منذر عدنان خلف[1] أسماعيل حسين عزيز[2] مهدي صبر لعيبي[3]

[1]طالب دراسات عليا/ معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الأحيائية /جامعة بغداد
[2]معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الأحيائية /جامعة بغداد
[3]كلية العلوم / جامعة واسط

الخلاصة: تضمنت هذه الدراسة عزل وتشخيص لبكتريا *Proteus mirabilis* من مرضى يعانون من التهابات في المسالك البولية على مختلف انواعها (البسيطة والمعقدة) ومن انابيب القسطرة البولية التي تستخدم في حالات الالتهابات المعقدة والتشوهات الخلقية في اعضاء الجهاز البولي .تم جمع (310) عينة أدرار لمرضى يعانون من التهابات المسالك البولية من مستشفيات مختلفة لمدينتي بغداد والكوت للمدة من 1-1-2013 الى 1-8-2013 . أظهرت النتائج وجود (218) عزلة كانت موجبة للفحص البكتريولوجي ،وعند اكمال تشخيص العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام بالطرق الكيموحيوية واستخدام انظمة Api التشخيصية أظهرت بكتريا Proteus spp . نسبة عزل (17.88%) وبلغت نسبة عزل *P. mirabilis* (92,30%) اما نسبة عزل *P. vulgaris* فكانت (7.7%).

استخدم تفاعل سلسلة البلمرة (PCR) باستعمال بادئات نوعية (16SrRNA) (specific primer) للكشف عن وجود جنس المتقلبات Proteus spp وتمييزها عن باقي البكتريا المعوية وكذلك أستخدام بادئات نوعية متخصصة للكشف عن وجود الجينات (ureR). وأظهر تتائج التشخيص الوراثي بأستعمال بوادئ متخصصة للجين ureR الخاص بهذه الدراسة عن وجود 36عينة أعطت نتائج موجبة لعينات الأدرار كذلك سجلت نتائج دراسة تسلسل القواعد النتروجينية لنواتج تقنية PCR للعينات قيد الدراسة تطابقاً يصل الى (% 98) مع تسلسل القواعد النتروجينية لجين ureR الموجودة في عزلة *P.mirabilis* العائدة لمنظمة الصحة العالمية WHO 9. 3 .

المقدمة

يعد التهاب المسالك البولية من المشاكل الصعبة الواسعة الانتشار في العالم والذي يصاب بها ملايين من الاشخاص سنويا وتعد النساء اكثر ميلا من الرجال للاصابة بهذا المرض. إذ يأتي بالمرتبة الثانية بعد التهابات المسالك التنفسية اذ يتعرض الذكور والاناث للاصابة بهذا المرض ولاسيما وأنه يعد من المسببات الرئيسة لوفاة الاطفال الرضع (1) تعد بكتريا P.mirabilis من الكائنات المجهرية الانتهازية التابعة للعائلة المعوية لما تسببه من مشاكل صحية للانسان و الحيوان على حد سواء(2) ، اذ إنها تسبب خمج الجهاز الهضمي والجهاز التناسلي و تأتي الاهمية الطبية لهذه البكتريا بعد بكتريا Escherichia coli و بكتريا *Klebsiella pneumonia* لما تسببه من مشاكل صحية و اصابات مرضية للجهاز التناسلي و الجهاز الهضمي و الاجهزة الاخرى (3) .

تسبب بكتريا Proteus بصورة رئيسة خمج المسالك البولية ولاسيما النوع *P.mirabilis* وعلى الرغم من ذلك فانها تأتي بعد بكتريا *E. coli* في أحداث خمج المسالك البولية (4). تسبب هذه البكتريا خمج المسالك البولية للمرضى الراقدين في المستشفيات و

المستخدمين للقثطرالبولي و لمدد طويلة و كذلك الاشخاص الذين يعانون من مشاكل وظيفية و تشريحية غير طبيعية للمسلك البولي (5)، وأن قدرة هذه البكتريا على الاستيطان في المسلك البولي يعود الى أمكانية تخليق زوائد بروتينية تسمى الخمل تساعد على الالتصاق بالخلايا الطلائية البولية و الخلايا الطلائية الكلوية (6) .ان من اهم عوامل الضراوة Virulance factors لبكتريا *P.mirabilis* هي انتاج اليوريز urease . إنتاج الهيمولايسين Haemolysin. القابلية على الالتصاق بالخلايا الطلائية . الحركة بشكل امواج (الانثيال) Swarming بواسطة الاسواط Flagella . إنتاج البكتريوسين المعروف بـProticine (7). تهدف هذه الدراسة الى استخدام تقنية التفاعل المتسلسل لاجل التحري عن اجناس المتقلبات المسببة لالتهاب المسالك البولية.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات المرضية

جمعت عينات الإدرار (310عينة) للمدة من كانون الثاني لغاية أب 2013 من مرضى يعانون من التهابات المسالك البولية الذين تم تشخيصهم مسبقا من قبل اطباء مختصين ومن مستشفيات مختلفة لمدينة بغداد/ مدينة الطب (مستشفى الجراحات التخصصية، مستشفى بغداد التعليمي،مستشفى حماية الطفل ،المختبرات التعليمية لمدينة الطب) ، ومن مستشفيات مختلفة لمدينة الكوت (مستشفى الزهراء التعليمي، مستشفى الكرامة التعليمي، مستشفى البتول للولادة) وسجلت المعلومات المتعلقةبالمريض من العمروالجنس أوامراض أخرى في استمارة خاصة،وأستخدم لهذاالغرض قناني معقمةحجم 50 ملليلتروقدتم أخذ عينة الادرار الوسطي .زرعت مباشرة بعد أخذ العينة لغرض التشخيص (8)

زرع الأدرار Urine Culture

زرعت عينات الأدراربطريقة التخطيط (باستخدام ناقل زرعي قياسي معقم) على الوسط الأنمائي آكار الدم والوسط التفريقي اكارماكونكي،حضنت الأطباق في درجة 37م لمدة 18 —24 ساعة، بعدها تم تشخيص المستعمرات مظهريا اعتماداعلى الصفات الشكلية لها،من حيث شكل وحجم ولون تلك المستعمرات، واختيرت العزلات التي اعطت ظاهرة الأنثيال فضلا" على رائحة تشبه رائحة السمك على وسط اكارالدم، اماعلى وسط الماكونكي تم الأعتماد على اللون الشاحب للمستعمرات لكونهاغيرمخمرة لسكراللاكتوز Non Lactose fermenter ، نقلت العزلات المختارة الى وسط أكارماكونكي جديد (9) .

تشخيص العزلات

التشخيص الاولي

شخصت العزلات مظهريا وكذلك كيموحيويا. إذ شخصت العزلات مبدئيا اعتمادا على الصفات الشكلية للمستعمرات على وسط الماكونكي، وملاحظة ظاهرة الأنثيال Swarming على وسط اكار الدم. كذلك شخصت اعتمادا على الصفات الشكلية تحت المجهر إذ استخدمت صبغة غرام (gram stain) وفق محاليلها الوصف بالمصدر (10).

الاختبارات الكيموحيوية

اختبار حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية

اجري فحص الحساسية للمضادات الحيوية بطريقة صب الإطباق باستعمال الوسط الزرعي أكارمولر– هنتون ، وقد اختبر حساسية البكتيريا المشخصة اتجاه 11 نوعاً من المضادات الحيوية (11).

التشخيص باستعمال نظام Api- 20E

أجريت فحوصات كيموحيوية باستخدام نظام Api-20E وذلك لغرض تشخيص البكتريا المعزولة على إنها بكتريا المتقلبات.

استخلاص الحمض النووي DNA

تمت عملية آستخلاص الحمض النووي DNA من الخلايا البكتيرية المعلقة بمحلول مرق نقيع القلب والدماغ من عينات الادرار وحسب ما ورد في (12) بأستخدام عدة الاستخلاص المجهزة من شركة Geneaid.

البوادئ المستخدمة في تفاعل البلمرة

استخدمت بوادئ متخصصة للكشف عن الجين 16 S rRNA وكذلك الجين *ureR* (13).

أولاً: بادئ المتخصص بالجين *16 S rRNA*

البادئ	التسلسل	طول البادئ	حجم التضخيم
Forward	5-GGAAACGGTGGCTAATACCGCATAAT-3	26bp	101bp
Reverse	-5-GGAAACGGTGGCTAATACCGCATAAT-3	24bp	

ثانياً بادئ المتخصص بالجين *ureR*

البادئ	التسلسل	طولbpالبادئ	حجم التضخيم bp
Forward	5-GGTGAGATTTGTATTAATGG-3	20	225
Reverse	5-ATAATCTGGAAGATGACGAG-3	20	

الترحيل الكهربائي (Electrophoresis)

أجري الترحيل الكهربائي للتحري عن الدنا البكتيري بعد عملية الإستخلاص أو للكشف عن ناتج تفاعل PCR بوجود DNA قياسي لتمييز حجم حزمة ناتج تفاعل PCR على هلام الإكاروز .حضر الهلام 1% للتحري عن الدنا البكتيري بعد عملية الإستخلاصو 2 %للكشف عن ناتج تفاعل PCR على وفق ماذكره **Sambrook**وجماعته (14) وذلك بإذابة 1 او 2 غرام من الأكاروز في 100 مليلتر من محلول دارىء (1x) TBE المحضرمسبقاً، سخن الأكاروز الى درجة الغليان لحين إكمال ذوبان الهلام بعدها ترك ليبرد بدرجة 50 مئوية ثم أضيف مقدار 2 مايكروليترمن صبغة بروميد الاثيديوم بتركيز نهائي 0.5 مايكروغرام/مليلتر. صب هلام الأكاروز بهدوء في الصفيحة لمنع حدوث فقاعات هوائية وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة ملئ الحوض بدارئ TBE، بحيث يغطي سطح الهلام .

النتائج

أظهرت النتائج وجود هذه البكتريا في 39 عينة من مجموع 218 عينة موجبة للزرع البكتريولوجي . و كانت النتائج موزعة كالآتي:

- أعطت 218 عينة (70.32 %) نتيجة موجبة موجبة للزرع البكتريولوجي، منها 116 عينة (53.21%) موجبة عند الأطفال و102 عينة موجبة عند البالغين (46.78 %).
- من بين النتائج الموجبة الزرع كانت 39(17.88 %) حالة إصابة ببكتريا *Proteus spp* ، كان منها 22 (56.41%) حالة إصابة عند الأطفال و17 (43.58%) حالة إصابة عند البالغين اما توزيعها حسب الجنس فكان 15 (38.46%) حالة إصابة عند الذكور و 24 حالة

إصابة عند الإناث (61.53%) (جدول رقم–1).اما بقية العزلات فكانت تعود لأجناس بكتيرية أخرى وتم إهمالها.

- شكلت بكتريا *Proteus mirabilis* في هذه الدراسة النوع الأكثر شيوعاً إذ بلغت (36)(92.30 %) عزلة من (39) حالة إصابة ببكتريا *Proteus spp.* مقارنة بالنوع *P. vulgaris* الذي كانت نسبة عزله تبلغ (7.7 %) شكل رقم (1).

جدول (1) توزيع بكتريا *Proteus spp.* حسب العمر و الجنس في المرضى المصابين بالتهاب المسالك البولية

الجنس / العمر	الذكور		الاناث		المجموع	
	العدد	%	العدد	%	العدد	%
أطفال اقل من13 سنة	6	15.38	11	28.20	22	56.41
بالغين اكبر من 13 سنة	9	23.08	13	33.33	17	43.58
المجموع	15	38.46	24	61.53	39	100

تشخيص الأنواع التابعة لجنس *Proteus spp.*

تم تشخيص 39 عزله تابعة إلى جنس Proteus بالاعتماد على الاختبارات الكيموحيوية التي أشار لها Collee وجماعته (15) ، كانت 36 عزلة عائدة للنوع *P .mirabilis* وبنسبة عزل % 92.3 و3 عزلة عائدة للنوع *P. vulgaris* وبنسبة عزل (7.7 %) من بين مجموع البكتريا السالبة لملون كرام و المسببة لخمج المسالك البولية . أذ تميز النوع *P mirabilis*. بكونه سالب لاختبار الاندول وغير مخمر لسكر المالتوز ومنتج للـ Ornithine decarboxylase بينما النوع P. vulgaris تميز بكونه موجب لاختبار الاندول ومخمر لسكر المالتوز وغير منتج للـ Ornithine decarboxylase

نظام التشخيص (API 20E) Analytic Profile Index 20 Enterobacteriaceae

لتأكيد التشخيص لعزلات P .mirabilis ولاكتمال الاختبارات الكيموحيوية المهمة استخدمت نظام API20E وجاءت النتائج مكملة لنتائج الفحوصات الكيموحيوية.

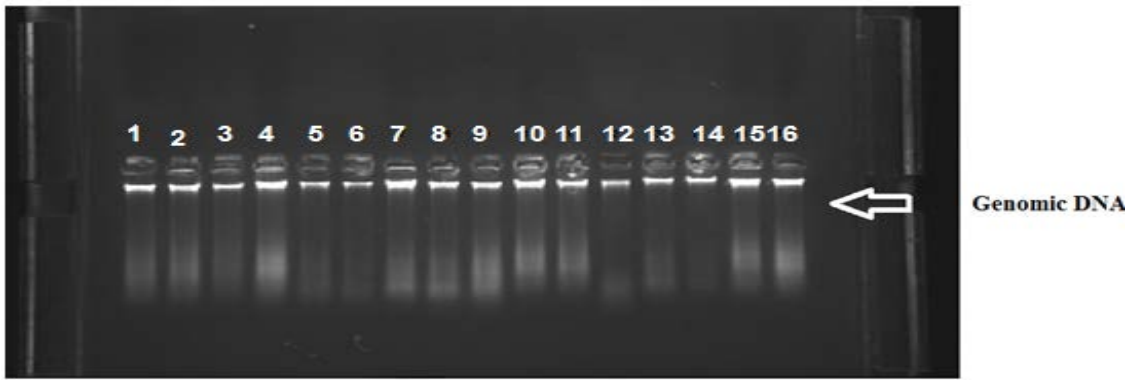
التشخيص الوراثي

استخلاص الحامض النووي DNA

استخلص الحامض النووي DNA من عزلات بكتيريا *P. mirabilis* بآستعمال عدة الإستخلاص المجهزة من شركة Geneied. نميت العزلات أولا على وسط أكار الماكونكي لتنشيط العزلات والحصول على غزارة بالنمو ثم لقح وسط مرق نقيع القلب والدماغ بهذه العزلات إذ تنمى العزلات المراد استخلاص المحتوى الوراثي منها مدة 24 ساعة ويستعمل كوسط مغذٍ لإنواع البكتيريا جميعها دون شروط وكانت نتائج الإستخلاص جيدة.

استعملت خلايا البكتيريا المعلقة في محلول مرق نقيع القلب والدماغ المعزولة من عينات الأدرار لمرضى مصابين بألتهابات المسالك البولية وطردت مركزيا بسرعة عالية (5000 دورة بالدقيقة) لمدة 5 دقائق لترسيب خلايا البكتيريا وأستكملت بعدها خطوات الأستخلاص وكانت نتائج الاستخلاص جيدة وبتركيز ونقاوة عاليين، أذ تراوح تركيز الحمض النووي DNA بين 10-100 نانوغرام/مايكرولتر ونقاوة تتراوح بين 1.5– 1.8 اعتماداً على قراءة الامتصاص للأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز Nano drop.

أظهرت نتائج الترحيل وجود حزم الحمض النووي (DNA) المستخلصة ذات حدة ووضوح عاليين مما يدل على التركيز والنقاوة العاليين ويبين الشكل (1) حزم الحامض النووي DNA.



الشكل (1): الترحيل الكهربائي للمحتوى الوراثي المستخلص بآستعمال هلام الأكاروز 1% (45 دقيقة ،7 فولت\سم). (مسار رقم 1،2،3،4،5،6،7،8 الحامض النووي DNA المستخلص من عزلات البكتيريا)

التشخيص بتقنية تفاعل السلسة المتعددة

تعد طريقة تشخيص البكتيريا بواسطة تقنية PCR من الطرق المهمة وذلك بسبب تضخيم (DNA) المستخلص من خلايا يكتيرية خلال ساعة وتعد هذه الطريقة من أسرع الطرق مقارنة بالطرق السابقة (16). شخصت البكتيريا بواسطة تفاعل PCR ذلك بآستخدام بادئ الجين 16sRNA وبادئ الجين ureR ويتكون مزيج التفاعل لهما كما في الجدولين(2،3) إذ تتم إضافة البادئ الأمامي و البادئ العكسي وDNA و الماء المقطر الخالي من الايونات الى الحفر الموجود في عدة AccuPower® PCR Premix الحاوية على المكونات المبينة في الجدول (4).

جدول (2) مزيج التفاعل الخاص لتشخيص الجين16S rRNA

المكونات	الحجم بالمايكرولتر
البادئ الأمامي	0.75
البادئ العكسي	0.75
DNA	1.5
ماء مقطر خالي من الأيونات	17
الحجم النهائي	**20**

جدول (3) مزيج التفاعل الخاص لتشخيص الجين*ureR*.

المكونات	الحجم بالمايكرولتر
البادئ الأمامي	0.75
البادئ العكسي	0.75
DNA	1.5
ماء مقطر خالي من الأيونات	17
الحجم النهائي	**20**

جدول (4) محتويات عدةAccuPower® PCR Premix

المواد	الحجم
$MgCl_2$	1.5 µM
dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	250 µM
Taq DNA polymerase	1 U
KCl	30µM
Tric-HCl (pH 9.0)	10 µM

التشخيص الوراثي لبكتيريا *sspProteus* بواسطة الجين *16sRNA*

هي تقنية متخصصة تمتلك حساسية عالية ويعتمد تشخيص كثير من أجناس البكتيريا على الجين *16sRNA* ويستخدم هذا الجين للدراسات التفريقية بين أنواع البكتيريا بالأضافة الى المايتوكوندريا (17). كما يستخدم كجين تفريقي لأنواع البكتيريا في الفحوصات السريرية الطبية (18).أجريت تفاعلات الكوثرة لعزلات ssp*Proteus* لتحديد جينات *16sRNA*المسؤول عن تشخيص وتمييز جنس المتقلبات *Proteus* عن باقي البكتيريا المعوية. باستعمال بادئات نوعية تستهدف جينات *16sRNA* بهدف التشخيص الدقيق لعزلات *Proteus* على هذا

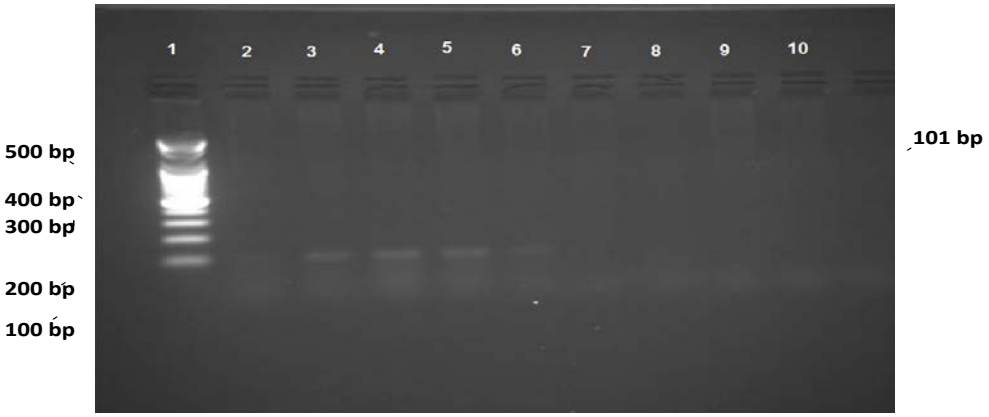
ألجين، والمجهزة من قبل شركة Bioneer, (Korea). تم تحديد الظروف المثلى للتفاعل بعد إجراء عدد من التجارب لغرض الوصول إلى الظروف المثلى جدول (5) إذ لوحظ إن أفضل تركيز DNA template كان 25 ng/ µl لذا اعتمد الدرجة 60 مئوية والتي أعطت أفضل النتائج في عدة تجارب وعند مقارنة حجم ناتج التجارب مع DNA القياسي بالترحيل الكهربائي كان الحجم تقريبا (101 bp)، الشكل– 2). ضبطت الظروف المثلى لتنفيذ تقنية PCR للجين*16sRNA*(الجدول–5).

جدول (5) الظروف المثلى لتشخيص ألجين *16sRNA*

التسلسل	المرحلة	درجة الحرارة المئوية	الوقت	عدد الدورات
1	DNAمرحلة المسخ الاولي	95	5 دقائق	دورة واحدة
2	DNAمسخ	94	30 ثانية	دورة 40
3	الالتحام	60	30 ثانية	
4	الاستطالة	72	10 ثانية	
5	مرحلة الاستطالة النهائية	72	10 دقائق	دورة واحدة

جدول (6) الظروف المثلى لتشخيص ألجين *ureR*

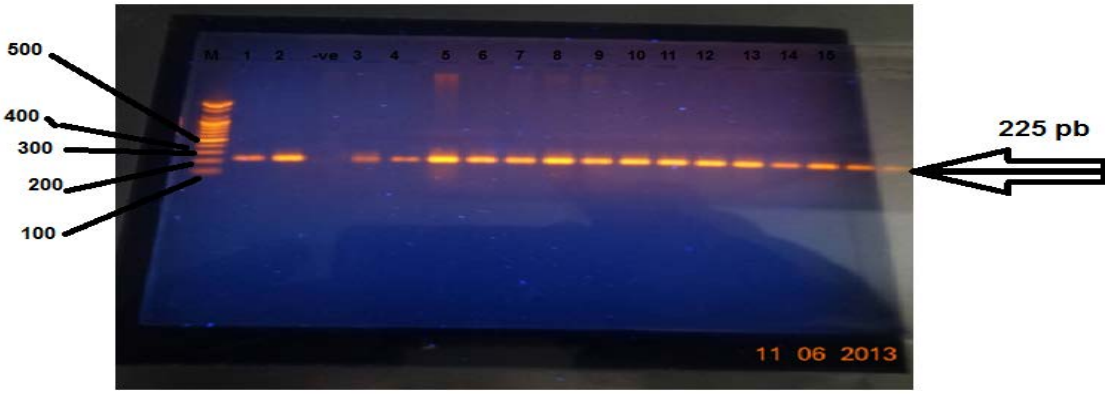
التسلسل	المرحلة	درجة الحرارة المئوية	الوقت	عدد الدورات
1	DNA مرحلة المسخ الأولي	4	دقائق4	دورة واحدة
2	DNAمسخ	94	ثانية40	دورة 40
3	الالتحام	58	1 دقيقة	
4	الاستطالة	72	ثانية20	
5	مرحلة الاستطالة النهائية	72	دقائق10	دورة واحدة



شكل (2) ترحيل كهربائي لناتج كوثرة لجين16sRNAعلى هلام الاكاروز بنسبة 1.5 % لمدة ساعة وبفرق جهد 70 % فولت

التشخيص الوراثي لبكتيريا *P. mirabilis* بواسطة الجين *ureR*

يعد جين *ureR* جين مهم في عملية تشخيص هذه البكتيريا (5). أعتبر الباحث Zhang وجماعته (13) أن جين ureR جين متخصص بشكل دقيق في تشخيص النوع *P. mirabilis* وهو المسئول عن انتاج أنزيم اليوريز وهو موجود في النوع *P. mirabilis* تم التحري عن جينات ureR والمسؤول عن إفراز اليوريز من عزلات بكتريا والمعزولة من حالات التهاب المسالك البولية ولمختلف الأعمار، واستعمل بادئات نوعية مخصصة ،بعد عدة تجارب تم تحديد أفضل تركيز وكان بحدود 25 نانوغرام / مايكرولتر. واستعملت الدرجات(50-56-58-60) مئوية حددت هذه الظروف بالاعتماد على أفضل النتائج التي ظهرت، وكان أفضل وهج تحت الأشعة فوق البنفسجية أفضل حزم منفردة متخصصة لناتج التفاعل عند درجة الحرارة 58 مئوية ، وتم الاعتماد عليه لإعطاء نتيجة موجبة بالنسبة للكشف عن جينات *ureR*، وذلك مقارنة النتائج مع حجم DNA القياسي بالترحيل الكهربائي إذ كان مقارب لـ (225 bp) كما في الشكل (3).



شكل (3) ترحيل كهربائي لناتج كوثرة لجين ureR على هلام الاكاروز بنسبة 1.5 % لمدة ساعة وبفرق جهد 70 % فولت

تسلسل جين ureR

تم معرفة تسلسل القواعد النتروجينية لجين ureR في((10 عينة)، إذ تم إرسال (50) مايكروليتر لكل عينة من ناتج تفاعل PCR مع البادئ الخاص لجين ureR الى شركة Macrogen في كوريا الجنوبية وبعد الحصول على النتائج وقورنت النتائج جميعها مع تسلسل القواعد النتروجينية لجين ureR الموجود في قاعدة البيانات العالمية بالرقم :http NCBI Reference Sequence N2-JH 815506.1.لخصت نتائج تحليل تسلسل الجين ureR في الجدول (5) وأظهرت أنه كان هناك (2) طفرة في (10) عينات من الجين ureR ، إذ كانت النسبة المئوية للطفرات (percentage of mutations) هي (20 %) العينات المدروسة. وتبين أن هناك طفرة واحدة في العينتين رقم (80-70) ان هذا التغاير في مكان ونوع الطفرة قد يؤدي إلى اختلاف تأثير هذه الطفرة. وبعض هذه الطفرات تؤدي إلى تغيرات في الشفرات الوراثية ومن ثم تغير في الأحماض الأمينية عند الترجمة التي تعد أهم الأسباب التي زادت من مقاومة هذا الجين(19).

جدول (7): انواع الطفرات في تسلسل الجين *ureR* في بكتيريا *P. mirabilis* المعزولة من المرضى

Sample Number	Mutation Site	Codon Number	Wild type Codon seq	Mutant type Codon seq	Mutant type
70	11	4	TAG	TGA	InsertionG
80	17	6	GAG	AGA	InsertionA
Total samples 10 2 sample mutant					

نوع الطفرات ونسبتها المئوية

كشف تحليل التركيب الوراثي لجين ureR بواسطة التسلسل أن هناك تغييرات وراثية. وأظهرت البيانات الموجودة في الجدول(8) أن هناك (0%) طفرة استبدال substitution) و(0%) طفرات حذف (Deletion) و (20%) طفرات غرس Insertion

Effect of mutations تأثير الطفرات

يبين الجدول أن هناك 20 % طفرة نوع Insertion مما قد يؤدي إلى التأثير في النمط الظاهري لكونها تؤدي إلى تبديل في الأحماض الأمينية ومن ثم في البروتين.

جدول (8) : يمثل عدد الطفرات ونسبتها الموية

Type of mutations	Number of mutation	%
Substitution	0	0
Deletion	0	0
Insertion	2	20
Total	10	20

المناقشة

أظهرت نتائج هذه الدراسة ان (218) عينة (70.32 %) و المأخوذة من (310) مريض قد أعطت نتيجة موجبة ، و تفق هذه النتيجة مع نتائج دراسات كل من Younis وجماعته (20)، Kumamoto و جماعته (21) وكذلك تتفق مع نتائج دراسات محليه لكل من Al-Taai (22) و(20) و Almarjani (23). تم تشخيص 39 عزله تابعة إلى جنس *Proteus* بالاعتماد على الاختبارات الكيموحيوية التي أشار لها Collee وجماعته (15) و Holt وجماعته (24)، كانت 36 عزلة عائدة للنوع *P .mirabilis* وبنسبة عزل (%) 92.3 و 3 عزلة عائدة للنوع *P. vulgaris* وبنسبة عزل (7.7 %) من بين مجموع البكتريا السالبة لملون كرام و المسببة لخمج المسالك البولية. أذ تميز النوع *P .mirabilis* بكونه سالب لاختبار الاندول وغير مخمر لسكر المالتوز ومنتج للـ Ornithine decarboxylase لتأكيد التشخيص لعزلات *P .mirabilis*. ولاكمال الاختبارات الكيموحيوية المهمة استخدمت نظام API 20E . (25)، (26)،أظهرت نتائج التشخيص المظهري و البايوكيمياوي ان نسبة عزل بكتريا جنس *sppProteus* هي (17.88 %) و هذا يتفق مع نتائج Al-Taai(22) ولكنها بنفس الوقت لا تتفق مع النتائج التي توصل أليها الباحث

Mehr وجماعته (27) والباحث Khurana وجماعته (28) وربما يعود ذلك إلى اختلاف العتر الجينية الموجودة في دول مختلفة من العالم.

أوضحت الدراسة الحالية إن معظم عزلات بكتيريا P. mirabilis حساسيتها الى المضادات Norfloxacin و Ciprofloxacin و Amikacin Meropenem, تتفق هذه النتيجة مع ما توصل أليه Singh وجماعته (2011) في الهند وكذلك مع Raka وجماعته (29) أن مضاد Ciprofloxacin هو الأفضل في علاج التهابات المسالك البولية.

اظهرت النتائج ان الدرجة 60 مئوية والتي أعطت أفضل النتائج في عدة تجارب وعند مقارنة حجم ناتج التجارب مع DNA القياسي بالترحيل الكهربائي كان الحجم تقريبا (101 bp) وهذه النتيجة مطابقة مع نتائجZhangوجماعته (13) بالاعتماد على الجين *16sRNA*.وهذا مطابق ما أعتمده الباحثون Limanskiĭ وجماعته (30) و Mansy وجماعته (31) و Takeuchi وجماعته (32) على تشخيص بكتيريا *P. mirabilis* بواسطة الجين*16sRNA*وكذلك اعتمدالباحث Mollet وجماعته (33) التسلسل الجيني *16sRNA* في تشخيص بكتيريا *P. mirabilis* من الحالات السريرية في حين وجد الباحث Yang وجماعته (34) ان التسلسل الجيني *16sRNA* هو المسئول عن المقاومة التي تمتلكها بكتيريا *P. mirabilis* ضد المضادات الحيوية من مجموعة لامينوكلايكوسيد، كذلك شخص الباحث Rothman وجماعته (34) بكتيريا *P. mirabilis*بالاعتماد على الجين *16sRNA* من حالات مرضية بوجود البكتيريا في الدمأشار الباحث Zhang وجماعته (13) أنه يمكن الاعتماد على جين ureR في تشخيص هذا النوع من البكتيريا حتى من العينات المأخوذة بشكل مباشر من الطبيعة وهذه العملية ربما تحتاج أقل من ثلاث ساعات.

يعد جين ureR أفضل وأكثر تخصص من جين uerC في تشخيص P. mirabilis حتى لو كان عدد البكتيريا قليل في العينة (35),(32) بينما لاحظ الباحثان Hagi وجماعته (36),(37) أن تشخيص النوع P. mirabilis بواسطة الجين ureR أكثر تخصصا. وخلاصة الدراسة هي إمكانية الاعتماد على تقنية PCR لجينات sRNA16 و ureR في تشخيص بكتريا P. mirabilis وبالتالي اختصار الوقت والكلفة وهذا ما تصبو إليه دراسات الوراثة الجزيئية بالنسبة لتشخيص الاحياء المجهرية.

References

1. Delzell efever , M.L. ," Urinary tract infection during pregnancy" . The American Academy of family physicians, Feb .1. 2000.
2. Penner, J. L. (1984) Genus XI *Proteus* In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (Kreig, N. R. and Holt, J. G., eds.). William and Wilkins Baltimore, MD. P.491-494
3. Chown, A. W.; Taylor, P. R.; Yoshikaw, T. T. and Guze, L. B. (1979).Anosocomial outbreak of infection due to multiply resistant *Proteus mirabilis*: role of intestinal colinization as amajor reservoir. J. Infect. Dis. *130*:621-627
4. Ramakrishnan, K. and Scheid, D.C. (2005). Diagnosis and Management of acute pyelonephritis in adults.American family physician.*71*(5): 933-942.
5. Mobley, H.L.T.; Island, M.D.; &Hausinger, R.P.(1995). Molecular Biology of Microbial Ureases.Microbiological Reviews. 59(3): 451-80
6. Wray, S. K.; Hull, S. I.; Cook, R. G.; Barrish, J. and Hull, R. A. (1986). Identification and characterization of auroepithelial cell adhesion from

auropathogenic isolate of *Proteus mirabilis.* Infect. Immun. *54(1)*:43-49.

7. Zunino, P.; Piccini, C. &Legnani-Fajard, C. (1999) Growth, Cellular Differentiation and Virulance Factor Expression By *Proteus mirabilis* In Vitro And In Vivo. J. Med. Microbiol. 48: 527-34.
8. Rajehwari ,H. ; Nagaveni ,S .; Oli , A. and Chandrakanth,K. (2010) Multiple Antibiotic Resistance and Esbl Producing *Klebsiella pneumonia* isolated from clinical Urine Samples . 5(1): 89-9
9. Liaw, S.J., Lai, H.C.; Ho, S.W.; Luh, K.T.& Wang, W.B. (2003) Role of RsmA in the regulation of swarming motility and virulence factor expression in *Proteus mirabilis.* Journal of Med. Microbiol. 52: 19-28
10. Goldman, E. and Lorrence, H. G.(2009) Practical Handbook of microbiology. 2nd ed. Printed in the USA.
11. CLSI.(2006) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard M7-A7. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute
12. Santos, C.; Texeira, F.; Vicente, A. and Astoifi-Filho, S. (2003) Detection of C. trachomatis in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. Braz. J. Infect. Dis., Brazil. 7:91-95
13. Zhang, W., Niu, Z. Yin, K. and Liu, P. (2012) Quick identification and quantification of Proteus mirabilis by polymerase chain reaction (PCR) assays. Ann Microbiol, DOI 10.1007/s13213-012-0520-x
14. Sambrook, J.; Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning and laboratory manual 2nd ed. Cold spring Harbour laboratories, New York.
15. Collee, J.G.; Miles, R.S. and Watt, B. (1996).Practical Medical Microbiology. Churchill. Living Stone, London
16. Winfiela, M. D. and Groisman E. A. (2003) Phenotype difference between *Salmonilla* and *Eschcerichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. PNAS.101:17162-17167
17. Kolbert, CP; Persing, DH (1999) Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens.*Current Opinion in Microbiology* 2 (3): 299–305
18. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991). "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study".*J Bacteriol* 173 (2): 697–703
19. Chaudhary, N. K. and Murthy, S. M. (2013) Extended ExpectrumBetalactamases in Uropathogen. Asian J Pharm Clin Res, Vol 6, Issue 3, 2013, 207-210
20. Younis, D., Mustafa, K. and Yahia, M. (2009) Role of Some Pathogenic Bacteria in Urinary Tract Infection in Mosul City.Al-TtaqaniJ. ISSN: 1818653X Year: 2009 V: 22 Issue: 2 Yu, F., Pan, J. Ding, B.,
21. Kumamato, Y., Tsukamoto, T., Hirose, T., Yokoo, A. & Takahashi, T. (1997) Comparative Studies on Activities of Antimicrobial Agents Against Causative Organisms, Isolated From Patients With U.T.I$_s$. 11 Backgrounds of Patients.Japn. J. Antibiotic. 50: 251- 64.
22. AL-Taai, H. R. R. (2005) Bacteriological, Biochemical and Molecular Study of p*roteus mirabilis* Isolated from Urinary Tract Infections in some Hospitals of Baghdad City. PhD thesis, AL-MustansiriyaUniv, 180 p
23. Almarjani, M.F.(2000) Multiple antimicrobial resistance and some virulence factors of *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infection and study of their plasmid content. M.Sc. thesis Al-Mustansiriya Univ. (In Arabic).
24. Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.A.; & Williams, S.T. (1994) Bergy's Manual of Derminative Bacteriology. (9th) ed. Williams and Wilkins
25. Turton ,J.F.;Hatice, B.; Siu,L.K.; Mary,E.K. and Tyrone,L.P. (2008) Evaluation of amultiplex PCR for detection of serotypes K1,K2and k5 in *Klabsillasp*.and comparison of isolates within these serotypes. FemsMicrobiolLett 284,247-252
26. York, M.K.; Brooks, G.F. and Fiss, E.H.(1992). Evaluation of the auto SCANW/A rapid system for Identification and Susceptibility testing of gram negative fermentative bacilli. J. Clin. Microbiol.;30(11):2903-10.
27. Mehr, S.S.; Powell, C.V.; Curtis, N.(2004) Cephalosporin resistant urinary tract infections in young children. J. Paediatr. Child.Health. Jan-Feb. 40(1-2): 48-52 Microbiol. *24*:175-180.
28. Khurana, S.; Taneja, N.; Sharma, M. (2002). Extended-spectrum beta-lactamase mediated resistance in urinary tract isolates

of family *Enterobacteriaceae*. Indian J.Med.Res. Oct.116: 145-9

29. Singh, V., Chauhan, P. K. ,Kanta, R., Puri, A. andGarg, B.R. (2011) Antimicrobial sensitivity and resistance pattern of bacteria causing UTI infection in pregnant women, J. of Pharmacy Research 2011,4(7),2361
30. Limanskiĭ A, Minukhin V, Limanskaia O, Pavlenko N, Mishina M,Tsygenenko A (2005) Species-specific detection of *Proteus vulgaris*and Proteus mirabilis by the polymerase chain reaction. ZhMikrobiolEpidemiolImmunobiol 3:33–39
31. Mansy MSM, Fadl AA, Ashour MSE, Khan MI (1999) Amplificationof *Proteus mirabilis* chromosomal DNA using the polymerasechain reaction. Mol Cell Probe 13:133–140
32. Takeuchi H, Yamamoto S, Terai A, Kurazono H, Takeda Y, Okada Y,Yoshida O (1996) Detection of Proteus mirabilis urease gene inurinary calculi by polymerase chain reaction. Int J Urol 3:202–206
33. Mollet C, Drancourt M, Raoult D. (1997*) rpoB*sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. MolMicrobiol 1997; 26(5):1005-11.
34. Rothman, R. E. Maulik, M. D., Gabor D., Guillermo M., Charlotte A. G., Tarik W., and Thomas C. (2002) Detection of Bacteremia in Emergency Department Patients at Risk for Infective Endocarditis Using Universal *16S rRNA* Primers in a Decontaminated PCR Assay. J. Infect. Dis. 2002;186:1677–81
35. Huang HS, Chen J, Teng LJ, Lai MK (1999) Use of polymerase chain reaction to detect Proteus mirabilis and Ureaplasmaurealyticum in urinary calculi. J Formos Med Assoc 98:844–850
36. Hickman, F. W.; Farmer, J. J. D.; Steigerwalt, A. G. and Brenner, D. J. (1982) Identification of *Proteus penneri* sp. Nov., formerly known as *Proteus vulgaris*indole negative or as *Proteus vulgaris* biogroup1. J. Clin. Microbiol.*15*:1097-1102.
37. Naas, T.; Benaoudia, F.; Massuard, S. &Nordman, P. (2000) Integron-located VEB-1 extended- spectrum β -Lactamase gene in *a proteus mirabilis* clinical isolate from Vietnam. J. Antimicrob. Chemoth. 46: 703-711.