مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 22 (10) 2017
ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

عزل وتشخيص بعض الأنواع البكتيرية المعزولة من حصى الكلى وتحديد بعض جينات الضراوة لبكتريا *Proteus mirabilis*

عقيل حسين علي العاصي[1] ، أمين سليمان بدوي[2] ، هالة عبد الخالق عوض الحديثي[1]

[1]قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

[2]كلية الزراعة ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص

تضمنت الدراسة الحالية جمع عينات (68) حصى كلى من المرضى الخاضعين لجراحة رفع الحصى في مستشفيات مدينة تكريت وللفترة من شهر نيسان 2012 الى شهر ايار 2013. ولقد أظهرت نتائج الدراسة أن نسبة المصابين الذكور (64.71%) بينما كانت نسبة المصابين من الإناث (35.29%) أي تفوق الذكور على الإناث نسبة (1.83:1)، أعطت (52) عينة نتيجة موجبة للزرع البكتيري، وأظهرت نتائج التشخيص واعتماداً على الاختبارات الكيموحيوية و API 20-E system أن بكتريا *E.coli* و *Ps.aeruginosa* الأكثر عددا من بين الأنواع البكتيرية الأخرى وبنسبة عزل (30.76%) و (21.22%) على التوالي، أما بكتريا *P.mirabilis* فقد أعطت نسبة عزل (15.38%) ، وتلتها بكتريا *Kl.pneumoniae* و *Citrobacter.freundii* بنسبة عزل (9.6%) و(5.76%) على التوالي ، فيما أعطت بقية الأنواع البكتيرية (*Staph.aureus* ، *Acinetobacter.freundii* ، *E.faecalis* *Serratia..marscenes*) نسبة عزل متساوية (3.84%) ، في حين لم تتجاوز نسبة عزل بكتريا *Staph.epidermidis* (1.92%). ، كشفت نتائج التحري عن وجود جينات (*mrp*A، *zap*A، *ure*C) باستخدام التفاعل التسلسلي لأنزيم بلمرت الدنا (PCR) امتلاك جميع عزلات بكتريا *P.mirabilis* لجينات (*mrp*A، *zap*A، *ure*C) التي تشفر لعوامل الضراوة (اليوريز، البروتيز، القدرة على انتاج الخملmrp .

المقدمة

مرض حصى الكلى Kidney stone disease أو التحصي الكلوي Nephrolithiasis مشكلة عالمية شائعة والتي تصيب حوالي (10 – 6%) من مجموع السكان [27] إن مرض حصى الكلى هو من أكثر الاضطرابات (الإختلالات) البولية شيوعاً والذي يصيب الرجال والنساء على حد سواء وينتشر بشكل عالي بين الرجال [17]، إذ إن أكثر من 5% من النساء الأمريكيات و12% من الرجال تتطور لديهم حصى الكلى خلال فترة معينة من حياتهم [30])، *Proteus mirabilis* وهي بكتريا عصوية الشكل سالبة لصبغة كرام، تقع ضمن العائلة المعوية Enterobacteriaceae وهي ممرضات انتهازية ومعروفة جيداً بحركتها السطحية المتعددة الخلايا والتي يطلق عليها العج Swarming [31]. تتضمن المضاعفات الخطيرة التي تظهر من الإصابة بـ U.T.I التي تحدثها بكتريا *P.mirabilis* تكوين حصاة المثانة bladder والكلية kidney Stones ، انسداد القسطرة بسبب تكوين الغشاء الحيوي Biofilms وتجرثم الدم [5] (bacteremia) وتعود قدرة البكتريا على إحداث هذه الأخماج إلى امتلاكها للعديد من عوامل الضراوة ومنها الحركة التموجية Swarming بواسطة الأسواط Flagella، الالتصاق بالخلايا الطلائية بواسطة الخمل Fimbriae، الأنزيمات (اليوريز urease ، الذي يحلل اليوريا إلى NH_3, CO_2)، الأنزيمات المحللة للبروتينات الشاطرة للكلوبيولينات المناعية نوع Proteolytic Enzymes IgA, IgG ، التوكسينات (الهيمولايسين Hemolysin، proteus toxin agglutini (pta) بالإضافة إلى التوكسينات الداخلية (Endotoxins [34, 29, 12])، ويعد تكوين الحصاة البولية urolithiasis من السمات المميزة للإصابة بـ U.T.I التي تحدثه بكتريا *P.mirabilus* ، وتتكون هذه الحصاة نتيجة لفعالية أنزيم اليوريز البكتيري bacterial urease إذ يعمل على تحلل هذه المركبات إلى أمونيا و CO2 كناتج نهائي والذي يرفع قاعدية الإدرار[26,11].

أهداف البحث

1- عزل وتشخيص الانواع البكتيرية المؤدية لتكوين لحصى الكلى وتحديد عزلات بكتريا *P.mirabilis* من بين الانواع البكتيرية الاخرى.

2- التحري عن بعض جينات الضراوة لبكتريا *P.mirabilis* (*zap* A, *ure* C, *mrp*A).

المواد وطرائق العمل

شملت الدراسة بجمع العينات من (68) مريض من المصابين بحصى الكلى الذين اخضعوا لجراحة رفع الحصى الكلوية في مستشفى تكريت التعليمي والمستشفيات الاهلية في مدينة تكريت للفترة من شهر نيسان 2012 الى شهر ايار 2013 واللذين تراوحت اعمارهم من 3- 70 سنة.، وقد نقلت الحصى من داخل صالة العمليات الجراحية بأستعمال أدوات نظيفة ومعقمة ثم وضعت في عبوات زجاجية او بلاستيكية نظيفة ومعقمة وبحجم مناسب للحصوة، غسلت الحصاة بالماء المقطر المعقم (D. W) أربع مرات على الأقل لأزالة المخلفات الملتصقة بها من دم ومخاط وغيرها، تم أجراء الزرع البكتيرلوجي لمسحوق الحصاة وذلك بأخذ جزء من المسحوق ثم تم وضعه في وسط مرق نقيع القلب والدماغ السائل Brain heart infusion broth، لغرض تنشيط نمو البكتريا في حالة وجودها، حضنت بعدها هوائيا بدرجة حرارة37مْ لمدة 24 ساعة بعد التحضين اخذ بوساطة عروة ناقل loup جزء من النمو

وزرعت بطريقة التخطيط في وسط اكار الدم واكار ماكونكي ثم حضنت بعدها الاطباق هوائيا بدرجة حرارة 37مْ ولمدة 24 ساعة [10, 14,15].

الاوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة:

الاكار المغذي Nutrient Agar،المرق المغذيNutrient broth، وسط أكار الدم الأساس Blood Agar base ، وسط أكار ماكونكي MacConkey Agar ، وسط اكار اليوريا Urea Agar ،وسط ماء البيتون Peptone Water Medium ، وسط سترات السايمون Medium Simmon Citrate وسط اكار ثنائي السكريات مع الحديد Kligler Iron Agar ، وسط الايوسين أزرق المثيلين Eosine Methylene blue (EMB).

عزل وتشخيص العزلات البكتيرية Bacterial Isolation and Identification

تم تشخيص المستعمرات البكتيرية مبدئياً أعتماداً على صفاتها الشكلية والزرعية على الأوساط الزرعية والمتضمنة حجم ولون وحافات وأرتفاع المستعمرات وقدرتها على تخمير سكر اللاكتوز وقدرتها على أنتاج المادة المخاطية وأنتاج الهيمولايسين، كما تم التركيز على المستعمرات التي تميزت بظاهرة التموج (الانثيال) Swarming phenomenon على وسط اكار الدم التي تسببها انواع جراثيم المتقلبات، كما تم ملاحظة صفات الخلايا تحت المجهر بعد تصبيغها بصبغة گرام، وتم أجراء الأختبارات الكيموحيوية أعتماداً على مصنف بيركي [18]، وعلى وفق المخطط التشخيصي الذي يتضمنه [23] بعدها أستخدمت عدة التشخيص API E 20 System لغرض التشخيص النهائي (BioMérieux, France) وحسب تعليمات الشركة المصنعة (المجهزة)

أستخلاص الدنا المجيني Genomic DNA Extraction

تم اجراء عملية استخلاص الدنا المجيني لعزلات بكتريا *Proteus mirabilis* باستخدام عدة OMEGA mini kit (USA) وحسب توصيات الشركة المنتجة.، حضر مزيج التفاعل للدنا المجيني لعينات الـ *Proteus mirabilis* المدروسة وقد استخدم في التفاعل ثلاثة أنواع من البادئات النوعية Specific primers التي تستهدف جينات خاصة بالبكتريا المعزولة (*ure* C, *zap* A, *mrp* A) لتحديد عوامل الضراوة *P. mirabilis* ، وتم عمل مزيج التفاعل باستخدام عدة PCR-premix kit (المجهزة من شركة BioNEER) وبحجم نهائي (20)µl.

طريقة العمل لتفاعلات الـ PCR Experimental protocol PCR

أجريت تفاعلات الـ PCR تحت ظروف معقمة وتضمنت الخطوات التالية :-

1-تم ضبط تركيز الدنا في كافة عينات الدنا للحصول على التركيز المطلوب (25-50) نانوغرام لأجراء تفاعلات الPCR .

3- تم تحضير خليط التفاعل الرئيسي لعينات الدنا لعمل تفاعل البلمرة المتسلسلة الـPCR وذلك بمزج مكونات التفاعل في أنابيب eppendorf tubes وبحجم نهائي (20) مايكروليتر (مع مراعاة ان تكون ظروف العمل في هذه المرحلة تحت ظروف معقمة)، - مزجت مكونات التفاعل جيدا بوضعها في جهاز الطرد المركزي الدقيق Microfuge لمدة (3-5) ثواني spin لترسيب قطرات محلول التفاعل الموجودة على جدار الانبوب الداخلي.

4- أدخلت الانابيب بحذر وعناية في جهاز المبلمر الحراري لكل بادئ لأجراء التفاعل التضاعفي PCR وباستخدام البرنامج المناسب للتضاعف لكل بادئ أستنادا الى توصيات البحوث المستخدمة للبادئات المختلفة وقد طبقت تفاعلات الـPCR بأستخدام البرامج المناسبة على وفق ماجاء في [33,37].

الكشف عن نواتج PCR Detection of PCR product

الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز

Agarose gel electrophoresis

بعد اكتمال مرحلة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR، ثم الكشف عن نواتج التفاعل والتحري عن وجود الحزم النوعية للنواتج حسب اوزانها الجزيئية وذلك بترحيل العينات كهربائيا على هلام الاكاروز بتركيز (1-2%) بما يتناسب مع حجم قطعة الدنا للجين المدروس، وفقا ل [24].

تم تحميل نواتج الـPCR في حفر الهلام وبحجم (5) مايكروليتر في كل حفرة يتبعها الدليل الحجمي DNA Ladder (100bp) في الحفرة المخصصة على احد جانبي الهلام.

بعد ملئ جميع الحفر المطلوبة يمرر التيار الكهربائي بفرق جهد 50 فولت، لفترة تراوحت من (ساعة ونصف - ساعتين).

بعد أنتهاء عملية الترحيل الكهربائي في الهلام تم فحص الهلام بالاشعة فوق البنفسجية بعد تصبيغه بالايثيديوم بروماید ثم التصوير في جهاز E.graph للتحري عن وجود حزم الدنا حسب الاحجام الجزيئية الخاصة لكل حزمة.

وقد قدرت الاحجام الجزيئية لنواتج التضاعف اعتمادا على المسافة التي قطعتها كل حزمة ومقارنتها مع قطع من الدنا معروفة الحجم الجزيئي وهي الدلائل القياسية Standard DNA Ladder Marker وقد استعمل الدليل الحجمي DNA ladder (المجهزة من شركة Biolabs) كمؤشر لحجم قطع الدنا التي ظهرت بعد أجراء تضاعف البلمرة المتسلسلة PCR اذ يعطي هذا الدليل ذو الحجم الجزيئي (100 bp) في هلام الاكاروز (12) حزمة ذات احجام جزيئية معروفة وقد تراوحت هذه الاحجام الجزيئية بدأً من الاعلى 1517bp، 1200، 1000، 900، 800، 700، 600، 500، 400، 300، 200، 100)، زوج قاعدة.

النتائج والمناقشة

جمعت العينات من (68) مريض من المصابين بحصى الكلى والذين أخضعوا لجراحة رفع الحصى الكلوية في مستشفى تكريت التعليمي والمستشفيات الأهلية في مدينة تكريت وللفترة من شهر نيسان 2012 إلى شهر آيار 2013 وقد توزع مرضى حصى الكلى بين 24 حالة

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

لدى الإناث بنسبة (35.29)% و 44 حالة لدى الذكور بنسبة (64.71)%. مما يعني أن نسبة الإصابة بالحصاة كانت السيادة فيها للذكور وبمعدل 1.83:1 إناث إلى الذكور، ويوضح الشكل (1) النسبة المئوية للإصابة بين الإناث والذكور لعينات هذه الدراسة.

الشكل (1) يمثل النسبة المئوية لعدد الأناث والذكور المصابين بحصى الكلى لعينات الدراسة

اتفقت نتائج دراستنا مع نتائج دراسات العديد من الباحثين ، فقد كانت مطابقة لما توصل إليه [2] من نتائج والتي أظهر فيها أن عدد الذكور(128) مريض يفوق عدد الإناث (75) مريض وبنسبة (1.7%) كذلك أظهرت نتائجنا تطابقاً مع ماتوصل إليه [1] من نتائج والتي أشارت فيها أن نسبة إصابة الذكور بحصاة الكلية (64%) أعلى من نسبة إصابة الإناث بالمرض (36%)، كذلك اتفقت هذه النتيجة مع نتائج[19] والتي ذكر فيها أن نسبة إصابة الذكور بالحصاة (65%) تفوق نسبة الإصابة عند الإناث والتي سجلت فيها إصابة تقدر ب (35 %)، كما أن النتائج التي توصلنا إليها مقاربة جداً إلى نتائج دراسة (16) والتي أظهرت أيضاً هذه الدراسات ارتفاع نسبة الإصابة بالمرض لدى الذكور مقارنة بنسبة الإصابة عند الإناث بنسبة (63 %) ذكور و (37%) إناث.

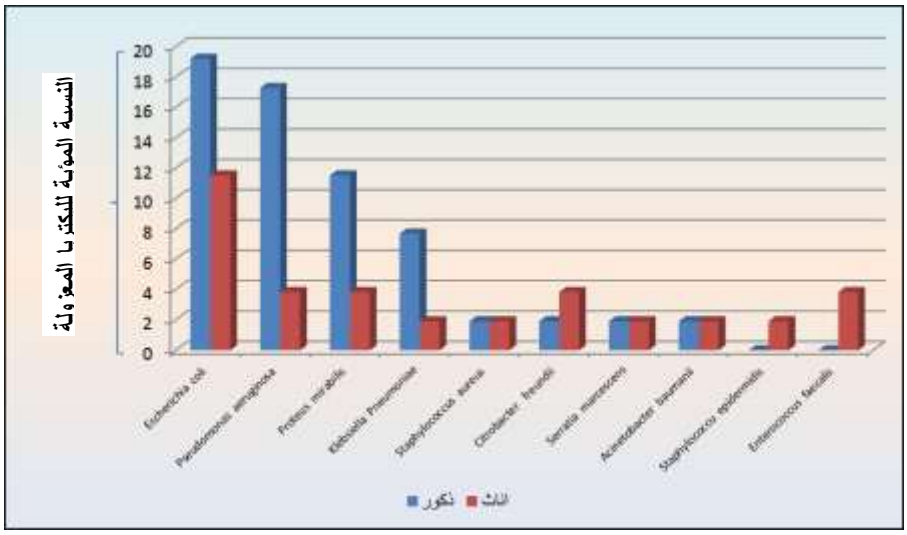
عزل وتشخيص البكتريا

Isolation and identification of bacteria

بينت نتائج عزل البكتريا من عينات الحصى الموجبة باعتماد الفحوصات الشكلية والكيموحيوية عزل كل من البكتريا الموجبة لليوريز (*K.pneumoniae, P.mirabilis, Ps.aeruginosa, Citrobacter .freundii, Staph.aureus, Staph.epidermidis*) ، وأنواع من البكتريا السالبة لليوريز (*E.coli, S.macescens , Acinetobacter. Baumanii , E.faecalis*) ، وبنسب عزل مختلفة وكما موضح في الشكل.(2)، فقد أظهرت بكتريا *E.coli* بانها النوع البكتيري الذي يحتل الصدارة ضمن الأنواع البكتيرية الأكثر عزلاً من الحصاة أذ بلغ عددها (10)عينات وبنسبة عزل (30.76%) من مجموع العينات الكلي الموجبة الزرع البكتيري (52) عينة . فيما احتلت بكتريا *Pseudomonas .aeroginosa* المرتبة الثانية ضمن البكتريا المعزولة من الحصى وبنسبة (21.22%)، تليها بكتريا *Proteus .mirabilis* بنسبة عزل(15.38)% ومن ثم بكتريا *Klebsiella .pneumoniae* بنسبة عزل (9.6%) ، كما أظهرت بكتريا *Citrobacter .freundii* نسبة عزل 5.76% من مجموع عينات الموجبة الزرع البكتيري .، فيما أظهرت كل من بكتريا *Staph .aureus*، *S.macescens*، *Acinetobacter. Baumanii , E.faecalis*، نسب عزل متساوية (3.84%) . كما أظهرت بكتريا *Staphylococcus aureus* بأنها أقل الأنواع البكتيرية عزلاً من الحصى وبنسبة عزل لاتتجاوز 1.92% .، ان هذه النتائج أتفقت مع نتائج دراسة [19] الذي أظهر فيها أن بكتريا *E.coli* هي النوع البكتيري الأكثر عزلاً من الحصاة بنسبة (38.09%) تليها بكتريا *Pseudomonas .aeroginosa* بنسبة (33.3%) ومن ثم بكتريا *Proteus. mirabilis* بنسبة عزل (11.9%) فيما احتلت بكتريا *Klebsiella .pneumoniae* المرتبة الرابعة بنسبة عزل (9.52%) كذلك أظهرت نتائجنا تقارباً مع نسبة عزل بكتريا *Enterococcus.facalis* (4.76%)، كما اتفقت مع نتائجنا التي أظهرت أن بكتريا Coagulase Negative *Staphylococcus* بأنها النوع البكتيري الأقل عزلاً من الحصاة بنسبة (2.38%) ، كذلك اتفقت نتائجنا أيضاً مع الدراسة التي أجريت من قبل [4] ، والتي احتلت فيها بكتريا *E.coli* الصدارة بنسبة عزل عالية (71%) مقارنة بنسب عزل الأنواع البكتيرية الأخرى من العائلة المعوية والتي عزلت فيها بكتريا *P.mirabilis* بنسبة (12%) تليها بكتريا *Klebsiella* بنسبة عزل 7%

وأختلفت نتائج دراستنا مع ماتوصل اليه [21] من نتائج والتي أظهرت فيها بكتريا *Pseudomonas .aeroginosa* نسبة عزل عالية بلغت (41.66%)، في حين سجلت بكتريا *E.coli* نسبة عزل أقل بكثير مما توصلنا اليه من نتائج والتي ظهرت بنسبة (16.66%) في حين أظهرت نتائج الباحث نسبة عزل أعلى لبكتريا *Klebsiella .pneumoniae* (16.66%)، أما في بكتريا *P.mirabilis* فقد عزلت بنسبة (8.33%) وهي أقل بكثير من نتائجنا.

في حين أظهرت بكتريا *Citrobacter freundii* أنها ذات نسبة عزل أعلى بكثير من نتائجنا (8.33%)، وهذا ينطبق أيضا على بكتريا Cougulase Negative *Staphylococcus* التي ظهرت بنفس نسبة العزل (8.33%) والتي لم تتفق مع نتائجنا التي اظهرت فيها نسبة عزل قليلة جدا لم تتجاوز (1.92%)، كذلك كانت نتائجنا مخالفة للنتائج التي حصل الباحث [2]، والتي أظهر فيها أن بكتريا *P.mirabilis* هي البكتريا ذات النسبة وجود الأعلى من باقي الأنواع البكتيرية *Staphylococcus aureus* ، *E.coli* ، *P.mirabilis* ، *Citrobacter.freundii* ، *K.peumoniae* بنسب عزل متفاوتة (0.98, 2.46, 2.46, 2.95, 3.44) على التوالي.



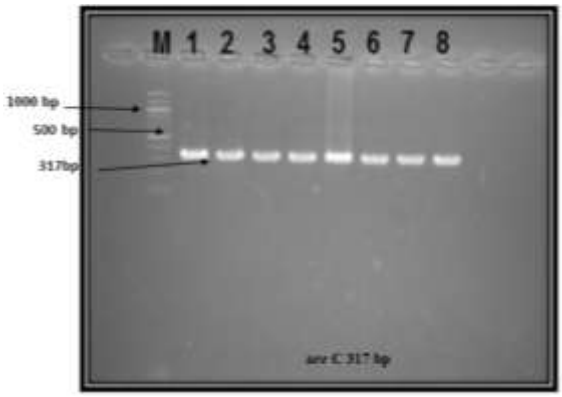
الشكل (2) يمثل النسبة المئوية للبكتريا المعزولة من الحصى وحسب الجنس

نتائج ترحيل نواتج الـ PCR للكشف عن وجود الجينات النوعية :

استخدمت في هذه الدراسة 3 بادئات (*mrp*A , *ureC* (317bp) , والتي استخدمت للكشف عن جينات الضراوة الخاصة ببكتريا *zap*A, *P.mirabilis*(*ure* C (317 bp), *zap* A, *mrp*A)، وتم التأكد من توحيد التراكيز لجميع عزلات الدنا المستخلصة من عزلات بكتريا *P.mirabilis* البالغ عددها (8) عزلات وذلك بعد إجراء التخافيف المطلوبة لتركيز الدنا الأصلي، وقد استخدم فيها الدنا بتركيز (50 نانوغرام / مايكروليتر (50 ng /µl) إعتماداً على جهاز Nanodrop.، حيث عدت النتيجة سالبة عند عدم ظهور حزمة على هلام الاكاروز ، من جانب آخر تعد نتائج الـ PCR للجينات النوعية موجبة عند ظهور حزمة على الهلام ومقارنة حجم الحزمة الناتجة ذات الحجم الجزيئي المعين (bp) مع الدليل الحجمي القياسي DNA Ladder (Marker) .

البادئان (*ure* C(317bp) , *zap* A(540) .

تم اجراء اختبار التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR) باستعمال البادئ *ure* C الذي استهدف التسلسل النوعي لجين *ure* C الذي يشفر لأنزيم اليوريز urease الذي يميز كعامل ضراوة مهم بسبب دوره في تكوين حصى الكلية والمثانة [20] ، وقد استخدم هذا البادئ في مزيج تفاعل اختبار الـ PCR لعينات الدنا الجينومي لعزلات بكتريا *P.mirabilis* الثمانية، وبالاعتماد على البرنامج الخاص به. وأكدت نتائج ترحيل الـPCR لعينات الدنا الجينومي على هلام الأكاروز بتركيز 2% وكما موضح في الصورة (1) ، ظهور حزم الدنا في جميع عينات دنا بكتريا *P.mirabilis* وبحجم جزيئي (317 bp) حيث تمكن هذا البادئ من التعرف على التتابعات المكملة له في الدنا المجيني لهذه البكتريا.



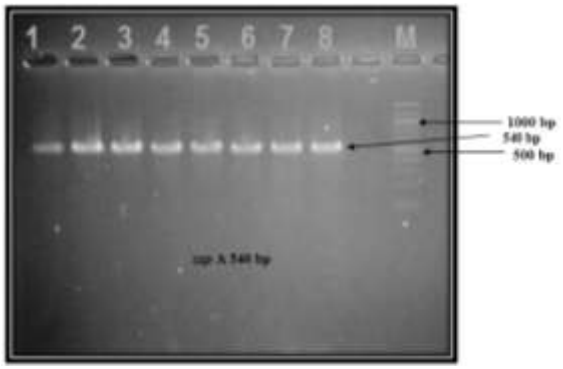
الصورة (1) تمثل الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل التضاعفي PCR لدنا DNA بكتريا *P.mirabilis* بأستعمال البادئ *ure* C والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 2%

Lane M: الدليل الحجمي القياسي (100 bp) DNA ladder .

Lane 1-8 : نواتج PCR لعزلات بكتريا *P.mirabilis* .

تم اجراء اختبار PCR باستعمال البادئ *zap* A الذي استهدف التسلسل النوعي لجين *zap* A الذي يشفر لأنزيم البروتيز Protease، حيث استخدم هذا البادئ في مضاعفة الدنا للعزلات الثمانية من بكتريا *P.mirabilis* وأظهرت نتائج ترحيل الـPCR لعينات الدنا على هلام الأكاروز والموضحة في الصورة (2) ظهور حزم الدنا في جميع عينات دنا بكتريا *P.mirabilis* (بحجم جزيئي bp 540)، حيث تمكن البادئ من التعرف على التتابعات المكملة له أيضاً في الدنا الجيني لعينات البكتريا، أتفقت النتائج التي حصلنا عليها كلياً مع ماحصل عليه[38]، والتي كشف فيها وجود عينات *ure* C, *zap* A المشفرة لأنزيمي اليوريز urease والبروتيز protease بالترتيب ، في جميع عينات الدنا لبكتريا *P.mirabilis* الاثني عشر التي تم دراستها وبنفس الحجم الجزيئي (540 bp ,317 bp) بالترتيب نفسه، وقد أكدت هذه النتائج أيضاً من قبل الباحث([32] والتي تحرى فيها عن وجود الجينات *zap*A,*ure* C في جينوم عزلات بكتريا *P.mirabilis*

باستخدام طريقة Multiplex PCR assay كطريقة سهلة وسريعة في الكشف عن جينات البكتريا والتي أظهرت نتائج الـ PCR بعد ترحيل ناتج التفاعل وجود الجينين *ure* C , *zap* A في جينوم جميع عزلات البكتريا حيث ظهرت مواقع الحزم واضحة وبنفس الأحجام الجزيئية *zap* A (540 bp), *ure* C (317 bp)، وقد أثبتت هذه الدراسات أن جينوم جميع عزلات بكتريا *P.mirabilis* تتضمن الجين *ure* C gene , *zap* A gene في تركيبها. كذلك اكدت هذه النتائج أن عوامل الضراوة الرئيسية لبكتريا *P.mirabilis* هي غير مشفرة على البلازميدات، وقد استخدم هذين البادئين الذين استهدفا جين *ure* C (317 bp) والجين *zap*(540 bp) أيضا في التشخيص النوعي الخاص لبكتريا *proteus*. إذ يعد احتواء جينوم البكتريا على الجين *ure* C المشفر لانزيم اليوريز فقط الى أن العزلات البكتيرية هي *P.vulgaris*، بينما يعد تضمين جينوم البكتريا على الجينين *ure* C(317bp)، *zap* A(540bp) الى أن العزلات البكتيرية هي *P.mirabilis*.



الصورة (2) تمثل الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل التضاعفي PCR لدنا DNA بكتريا *P.mirabilis* بأستعمال البادئ *zap* A والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 2%.

Lane M : الدليل الحجمي القياسي DNA ladder (100 bp).

Lane 1-8 : نواتج PCR لعزلات بكتريا *P.mirabilis*

حيث تنتج بكتريا*P.mirabilis* أنزيم اليوريز الذي يعد عامل ضراوة مهم لهذا النوع من البكتريا ، إذ يعمل الأنزيم على تحليل اليوريا الى CO_2، NH_3 وتكوين حصى الستروفايت Struvite أو الأباتيت apatite وتقع الجينات المشفرة لأنزيم اليوريز على الـ DNA الكروموسومي وتضم *ure* ABCDEFG (1988 [20]، والأنزيم الفعال هو Trimer مكون من *ure* A, *ure* B, *ure* C والذي ينشط من خلال حشر آيون النيكل Ni^{+2} ويضم *ure* C النيكل في مركزها المعدني[28] ، كما تنتج العديد من سلالات بكتريا *P.mirabilis* بروتيز خارج خلوي *Proteuse* extracellular والذي يشارإليه بـ immunoglobulin A Proteuse (IgA) إن الأنزيم المحلل للبروتين المنتج من قبل بكتريا *P.mirabilis* هو بروتين معدني Metalloprotcase الذي يعود إلى عائلة Family Serralysin للبروتين المعدني المعتمد على الزنك والذي يشفر من قبل جين يطلق عليه *zap* A [39]

البادئ *mrpA* المشفرة للخمل MR/P

تم إجراء اختبار التفاعل التضاعفي PCR بأستخدام البادئ mrp/A الذي استهدف التسلسل النوعي لجين الألتصاق mrp A gene لعينات الدنا الجينومي لعزلات بكتريا *P.mirabilis* قيد الدراسة، وبالاعتماد على البرنامج الخاص به، وقد أكدت نتائج الترحيل في هلام الأكاروز وكما موضح في الصورة (3) ظهور حزم الدنا في جميع عينات الدنا لبكتريا *P.mirabilis* وبحجم جزيئي (565 bp) والذي يؤكد أن وجود هذا الجين في جينوم عزلات بكتريا *P.mirabilis* المعزولة من الحصى إلى امتلاكها للخمل mrp A الذي يشفره هذا الجين، وهذه النتائج طابقت ماتوصل إليه [37] من نتائج باستعماله لنفس بادئ mrp A في إجراء اختبار التفاعل التضاعفي لعينات الدنا الجينومي من عزلات بكتريا *P.mirabilis* والتي أظهرت أيضاً أن جينوم كل عزلات البكتريا قيد التجربة تحوي جين *mrp A* المشفر لهذا الخمل ، من ذلك نستنتج أن هذا الجين هو صفة محمولة على الدنا الكروموسومي للبكتريا .، إذ تعبر سلالة الممرض البولي *P.mirabilis* بشكل متكرر عن الخمل ، كذلك وجد قدرة البكتريا في التعبير الجيني عن الخمل في كلية الجرذان المصابة بها، إذ يكون له دور مهم في الإصابة بالتهاب الكلى والحويض Pyelorephritis الذي تحدثه هذه البكتريا [36]. وهذا الجين يشفر إلى نمط الخمل المقاوم للمانوز – mannose Resistance Fimbriae والذي يعمل على حدوث التلازن الدموي مع كريات الدم الحمراء للإنسان حتى بوجود سكر المانوز الذي يعود إلى النمط V من الخمل V Type والذي يعد ذو الأهمية في التصاق البكتريا بالخلايا الطلائية المبطنة للقناة البولية ، حيث أن ارتباط الخمل MR /P بالخلايا الطلائية البولية خارج الجسم *in vitro* يعد خاصية مهمة لأجل استيطان البكتريا في الكلية والاحليل [34].

الصورة (3) تمثل الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل التضاعفي PCR لدنا DNA بكتريا *P.mirabilis* بأستعمال البادئ mrpA والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 2%.

Lane M : الدليل الحجمي القياسي DNA ladder (100 bp).

Lane 1-8 : نواتج PCR لعزلات بكتريا *P.mirabilis* .

حيث كشفت دراسات [35] عن ميل هذا النوع من الخمل (MR \ P) في الالتصاق النوعي بالخلايا الطلائية للنبيبات الكلوية للانسان وكذلك بالخلايا الطلائية البولية المنسلخة في الإدرار. ولقد أظهرت الدراسات أنه على الرغم من الدور الهام لخمل MR \ P بكتريا *P.mirabilis*، فان هناك لاصقات أخرى adhesion مهمة للبكتريا أيضاً تشترك في التصاقها بالخلايا الطلائية البولية للمثانة [25]، ولقد أشارت الدراسات أن الطفرة الحاصلة في خمل MR \ P Isogenic (mutant) لايمكنها التعبير عن الخمل، كما أن أعداد البكتريا الطافرة تسترجع بأعداد أقل من السلالة البرية Wild – Type من المثانة والكلية، فعلى الرغم من ذلك فقد أشارت الحقائق إلى أن هذه الطفرة لاتفقد البكتريا القدرة على الالتصاق أو الاستيطان في القناة البولية السفلى أو العليا [40]، من ذلك يتضح أن هناك عوامل ضراوة أخرى تشترك في أمراضية الجزء العلوي من القناة البولية، حيث فقدان خلية البكتريا لخمل MR \ P لايقضي بشكل كامل على قدرة البكتريا على الاستيطان في الكلية [8].

أذ قام [6,7] بعزل وتنقية الخمل MR \ P والذي أشار إلى أن الوحدة الرئيسية لمتعدد الببتيد MR \ P هو بروتين MR/P A ، والذي قدر الوزن الجزيئي له بحوالي(18.5) كيلو دالتون، والذي وجد أيضاً أن الخمل MR\P يتألف من 175 حامض أميني وأن هناك 25 حامض أميني محب للماء عند النهاية الأمينية ، ويعد خمل MR\P هو الأكثر أهمية لبكتريا *P.mirabilis* وأن هذا الخمل يشفر من قبل Operon Mrp الذي يشفر لـ 10 جينات تقع على الكروموسوم البكتيري [34].

المصادر

1-السعدون، رشا نزار حسون عبد الله. (2005). دور جراثيم *Proteus* في تكوين الحصى الكلوية والتهابات المجاري البولية. رسالة ماجستير. كلية العلوم، جامعة الموصل/ العراق.

2-فهد, حارث جبار. (2001). دراسة الجراثيم المرافقة لحصى الكلية. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، قسم علوم الحياة، جامعة بغداد / العراق.

3-Alexander, S.K and Srete, D.(2001). Microbiology " Aphotographic atlas for the laboratory" Benjamin Cummins, an imprint of Addison Welsey Longman , Inc.

4-Alkadasi, M, N., A-Ameri., G.A., Hansh, S., Ali, W.A.M., Naji, A.S., saif, N.A., Alsami, A and Zaid ,A.A.(2014).Incidence of rend stone disease among Urinary Tract infection Patients and antimicrobials Susceptibilty .Pelagia Research Library . Adv . Appl. Sci Res ., 5(3): 309-314 .

5-Aquilini, E.(2012). Lipopolysaccharide (LPS)core biosynthesis in proteus mirabilis. Ph.D. University Barcelona.

6- Bahrani, F. K., D. E. Johnson, D. Robbins, and H. L. Mobley.(1991**).** Proteus mirabilis Flagella and MR/P Fimbriae: Isolation, Purification, Nterminal analysis, and Serum Antibody Response Following Experimental Urinary Tract Infection. Infect. Immun. 59:3574-3580.

7-Bahraini , F.K; Cook, S; Hull, R.A; Massad, G. and Mobley, H.L.(1993). Proteus mirabilis fimbriae :N. Terminal amino acid sequences of amajor Fimbrial Subunit and Nucleotide sequences of The genes From two Strains Infect immun .61 : 884 – 891.

8-Bahrani, F. K., G. Massad, C. V. Lockatell, D. E. Johnson, R. G Russell, J. W. Warren, and H. L. Mobley. 1994. Construction of an MR/P Fimbrial Mutant of Proteus mirabilis: Role in Virulence in a Mouse Model of Ascending Urinary Tract Infection .Immune .62:3363-3371.

9-Baron, E.J; Peterson, L.R ; Feingold SM. (1994). Bailey & Scott's Diagnostic microbiology.9th ed. Mosby Company. USA.

10-Bratell S., Brorson J. E., Grenabo L., Hedelin H., and Petterson S: The bacteriology of operated renal stones. Eur. Urol., 1990; 17: 58-61.

11-Clapham, L; Mclean, R.J.C; Nickel, J.C; Downey, J and Costerton, J.W .(1990). The influence of bacteria on struvite crystal habt and its importance in urinary stone formation. J. Crystal Growth, 104: 475-84.

12-Coker, C; Poore, A; Li, X; Mobley, H. L. T. (2000). Pathogenesis of Proteus mirabilis urinary tract infections . Micrb . Infect . 2: 1497 – 1505.

13-Collee, J.G; Fraser AG, Marmion, B.P; Simmons, A. (1996). "Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology". 14th ed., Churchill Livingstone, New York. p. 413-423.

14- Dewan B., Sharma M., Nayak N., and Sharma S. K.(1997). Upper urinary tract stones and Ureaplasma urealyticum. J. Med. Res.; 107: 15-21.

15-Gault , M. H ; Longerich L. L; Crane G; Cooper R; Dow D; Best, L; Stockall, E; Brown ,W.(1995). Bacteriology of urinary tract stones. J. Urol.; 153: 1164-1170.

16-Gurau, G., Dobre, M., Paula, P., Matei ,M,N.,Lupoae, M., Voinescu, D.C.(2014) .Evalution of the chemical composition of Renal Stones .ANALELE Universitais "Dunarea Dejos" Galati Medicina. (1) : 111-118.

17-Hoe , L.W . (2007). Identification of BioMarker and Development of Screening Method for Kidney stones Disease. Msc, thesis. Universiti Sains Malaysia

18-Holt, J .G; Krieg, N .R, Sneath, P.H.A, Staley, J.T; Williams, S.T. (1994). Bergeys manual of determinable bacteriology 9th ed. William and Wilkins, Baltimore.

19-Janakiram, B; Suni Tha, T; Ba Bu, M,R; Swapna, G; Sekhar, B.C and Bondii . J.S. (2014). Etiology of Urolithiasis from South Indian population

: correlation of Recurrence and antibiotic Resistance to Biofilm production capabilities of uropathegenic Microbes .

20-Jones, B.D; Mobley, H.L.T.(1989). Proteus mirabilis Urease: Sequence determination and Comparison with Jack been Urease .J Bacteriol ; 171: 6414 – 6422.

21- Kore ,A.T., Singh ,G and pawar ,S.G.(2013) .Bacteriological Profile of urine in Patients with Urinary Calcoli .3(8) : 600- 601.

22-Koneman, E; Allen, S; Tanda, W; Procop, G; Schreckenberger, P; Woods, G. (2006). **Koneman's** color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6ed. Washington winn, Jr. United states of America .

23-Mahon, C; Manuselis, G. (2001). Text book of Diagnostic microbiology 2nd edition. W. B. Saunders Company.

24-Maniatis T; Fritsch E . F and Sambrook . (2001). In vitro application of DNA by the polymerase chain reaction , in Molecular Cloning : A laboratory manual . 2 nd ed , cold Spring Harbor Laboratory press , New york , U.S.A, P.691.

25-Massad,G; Bahraini, F and Mobley, H.L.T. (1994). Proteus mirabilis fimbriae : construction of an Isogenic pmf A mutant and analysis of Virulence in CBA meuse model of ascending Tract infection . infect ,Immune . 62 ,536 – 542.

26-McLean, R.J; Nickel, J. C; Cheng, K.J and Costerton, J.W. (1988). The ecology and pathogenecity of urease – producing bacteria in the urinary tract. Critical Reviews in Microbiology, 16(1): 37-79.

27-Mittal, R.D and Kumar, R. (2004).Gut-inhabiting bacterium *Oxalobacter formignes*: role in calcium oxalate urolithiasis. J. Endourol. **18:** 418-424.

28-Mobley, H. L., M. D. Island, and R.P. Hausinger. 1995. Molecular Biology of Microbial Ureases. Microbiological reviews 59:451-480

29-Mobley, H.L.T.(1996). Virulence of Proteus mirabilis.In: H.L.T. MOBLEY, J.W. WARREN (eds.) Urinary tract infections, molecular pathogenesis and clinical management. ASM Press, Washington DC, pp: 269-245.

30-Moe, O.W. (2006). Kidney stones: pathophysiology and medical management . Lancet , 367: 333-344.

31-Morgenstein, R. M., B. Szostek, and P. N. Rather.2010. Regulation of gene expression during swarmer cell differentiation in Proteus mirabilis. FEMS.. microbiology reviews 34:753-763.

32-Padmavathy, B; Vinoth Kumar, R; Patel, A; Deepika Swarnam, S; Vaidehi, T; Jaffar Ali, B . M .(2012). Rapid and Sensitive Detection of Major Uropathogens in asingle _ pot Multiplex PCR Assay. Curr Microbiol , 65 : 44-53.

33-Padmarathy, B; Vinoth Kumar ,R; Patel, A; Swarnam, S.D; Vaidehi, T; Ali, B.M.J. (2012). Rapid and Senstive Detection of Major uropathogen in a single – pot Multiplex PCR Assay. Curr Microbiol, 65: 44 – 53.

34-Rozalski, A.; Sidorczyk, Z. & Kotelko, K. (1997). Potential virulence factors of *Proteus bacilli* : Microbial Mol. Biol. Rev. 61: 65-89

35-Sareneva, T; Hol Tho fer, H and Korh oNen, T.K.(1990). Tissue. Binding Affinity of Proteus mirabilis Fimbriac in the Human urinary tract. Vol, 58: 10, P.3330- 3336 .

36-Silverblatt, F; Ofek, I. (1978). influence of pilli on the Virulence of Proteus mirabilis in experimental hematogeneous pyelonephritis J. infect. Dis.138: 664-667.

37-Sosa, V; Schlapp, G and Zunino, P. (2006). *Proteus mirabilis* isolates of different origins do not show correlation with virulence attributes and can colonize the urinary tract of mice. Microbiology, 152, 2149-2157

38-Stankowska, D; Kwinkoski, M; Kaca, W. (2008). Quantification of Proteus mirabilis virulence factors and modulathion by acylated homoserine Lactones .J. Microbiol Immunol Infeet ; 41: 243 – 253.

39-Wassif, C., D. Cheek, and R. Belas. (1995). Molecular Analysis of a Metalloprotease from Proteus mirabilis. J. Bacteriol. 177:5790-5798.

40-Zunino, P; G;preston, A; Sosa, V; Maskell, D.J.(2001).New aspects of The role of MR/P Fimbria in Proteus mirabilis urinary Tract infection FEMS Immunology and Medical Microbiology, 31: 113-120.

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)
مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 2017 (10) 22

Molecular detection of some genes virulent bacteria Proteus mirabilis isolated from kidney stones

Akeel H. Al-Assie[1] , Amin S. Badawy[2] , Halah A. A. Al-Hadithi[1]

[1] *Biology Departement , College of Sciences , Tikrit University , Tikrit , Iraq*
[2] *College of Agriculture , Tikrit University , Tikrit , Iraq*

Abstract

The current study Included the collection of samples (68) grit kidneys of patients undergoing surgery for lifting gravel in hospitals in the city of Tikrit and for the period from the month of April 2012 to the month of May 2013. The results of the study that people with the proportion of males (64.71%) while she was infected with the proportion of females (35.29 %) outweigh any male female ratio (1.83:1), diagnostic results showed depending on the biochemical tests and API-20system showed that *E.coli* and *Ps.aeruginosa* were the most frequent among other bacterial species and by isolating (30.76%) and (21.22%), respectively, while the bacteria P.mirabilis has given isolate percentage (15.38%) Followed by bacteria and *Kl.pneumoniae Citrobacter.freundii* by insolation (9.6%) and (5.67%) respectively, while giving the rest of the bacterial species (*Staph.aureus,, Acinetobacter. freundii*, *E.faecalis Serratia .marscenes*) isolation rate equal (3.84%), while isolating the bacteria Staph.epidermidis did not exceed (1.92%).The results of the investigation of the presence of genes,(mrpA, zapA, ureC) using polymerase chain reaction DNA (PCR) , Revealed that all isolates bacteria of *P.mirabilis* owning genes (mrpA, zapA, ureC) encoding virulence factors (urease, protease, the ability to produce pili (mrp).