



ISSN 2790 – 5985

eISSN 2790 – 5993

Agriculture College – Wasit University

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

Dijlah Journal of
Agricultural Sciences

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:

Proteus 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 سريرية مختلفة *Proteas mirabilis* عزل وتشخيص بكتيريا

منذر نعمان العزاوي¹ ، ميثال كريم عباس²

قسم علوم الحياة – كلية التربية – جامعة القادسية / العراق

الخلاصة

تعتبر بكتيريا *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 أو وراثياً من خلال عزل وتشخيص بكتيريا *P. mirabilis* من خلال حالات سريرية مختلفة والتحري 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 جزيئياً عن انزيم اليوريز من خلال ظهور جين ureC المسؤول عن الصفات التشخيصية في بكتيريا *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 اليوريز من مجموع 20 عزلة وظهور حزم وراثية بمستوى واحد و بحجم جزيئي واحد هو (317bp).

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، الهيموليسين، الإنزيمات) (Slattery et al., 2020). وتتميز عن بقية أفراد العائلة بإنتاجها لأنزيم Deaminase Phenylalanine (Levinson et al., 2016). *P. mirabilis* أحد 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).

يكن الدور الرئيسي في التهابات المسالك البولية المرتبطة بالقسطرة (CAUTI) التي تسببها المتقلبة الرائعة في قدرة هذا العامل المرضي على إنتاج اليوريز، وهو إنزيم معدني والذي يحلل اليوريا إلى ثاني أكسيد الكربون والأمونيا (Schaffer et al., 2015). تشفر مجموعة جينات اليوريز (ureDABCEFG) لأنزيم 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 ستروفييت (مغنيسيوم الأمونيوم والفوسفات) وبلورات الهيدروكسي باتيت (فوسفات الكالسيوم). هذه البلورات تصبح جزءاً لا يتجزأ من الأغشية الحيوية المتنامية، وهي ظاهرة تعرف باسم التمدن 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 دالتون (UreE)، 18 كيلو دالتون (UreF)، 23 كيلو دالتون (UreG)، 22 كيلو دالتون، تقوم بتشغيل عديدات الببتيد اللازمة لإدخال أيونات النيكل في المركز المعدني الناتج. في اليوريز، النشاط تحفيزيًا، يحتوي UreC على المركز المعدني للنيكل، وUreD، وUreE، وUreF، وUreG هي بروتينات ثانوية تساهم في تجميع المركب النشط ووضع أيون النيكل في المركز المعدني، ويتم نسخ جين ureR في الاتجاه المعاكس لـ ureDABCEFG (Al Jazeera et al., 1995).

ولهذه الأسباب، هدفت الدراسة الحالية إلى التحري مظهرًا 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 0.2 ± 7.2 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 تحضير 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 دس معقمة. يبرد أخيراً 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 ميكرومتر، 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 البيتون Peptone water medium

تم تحضير هذا الوسط بإذابة 20 جم من البيتون و 5 جم من كلوريد الصوديوم في كمية D.W. ، وتم ضبط الرقم الهيدروجيني إلى (7.2)، ومن ثم باستخدام D.W. اكتمل الحجم إلى 1000 مل، ثم تم تعقيمه بواسطة الأوتوكلاف، ونقلها إلى أنابيب معقمة بسعة 5 مل وتخزينها في 4 درجات مئوية تم استخدامه لإظهار قدرة البكتيريا على تحليل الأحماض الأمينية الترتوفان 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 لتصلب 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 أثناء 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 مزيج اللون إلى الشريحة. غالباً ما تكون مميزات اللون هي مذهب 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 المجهرى للشريحة Microscopic examination

يجب أن تخضع الشريحة للفحص تحت المجهر وفي غمرة الزيت. يجب أن يستخدم فحص الشرائح الأولى بقوة X40 والتأكيد على توزيع المسحة، ومن ثم ينبغي فحصها باستخدام القوة X100 بعد غمرها بالزيت. (Tripathi and Sapra 2020).

المرضى Patients

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 15 أغسطس 2023 ولغاية 15 نوفمبر 2023. حيث تم تسجيل اسم كل مريض وعمره وجنسه. والحالة السريرية الاساسية وتاريخ جمع العينات.

تشخيص العزلات البكتيرية بنظام Vitek-2 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 وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة (Biomérieux 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 ، وسداة 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:

أ- تم وضع ثلاثة مل من المحلول الملحي العادي في أنبوب اختبار و تلقى مع حلقة كاملة من مستعمرة واحدة في المزرعة ليلا.
ب- تم إدخال أنبوب الاختبار في آلة فحص adens لتوحيد المستعمرة إلى محلول McFarland القياسي = 108×1.5 خلية / مل).

ج- تم وضع اللقاحات الموحدة في الكاسيت.

د- ثم تم إدخال رقم تعريف العينة في برامج الكمبيوتر عن طريق الباركود. ثم كانت بطاقة Vitek-2 متصلة برقم معرف العينة.
هـ- تم وضع الكاسيت في وحدة الحشو ، عندما تم ملء البطاقات ، تم نقل الكاسيت إلى وحدة القارئ / الحاضنة.

حفظ وصيانة العزلات البكتيرية Preservation 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 الجلوسرين للحفاظ 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 تحضير 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 معاير McFarland 0.5 (نمو يعادل 108×1.5 خلية / مل).

التحليل داخل السيليكو لتسلسل عوامل الضراوة In-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 (ZapA و ureC و flaA) 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 تقليص 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 (2-3-2-2). من خلال طريقة الطعن ، تم تلقيح مستعمرة واحدة من ثقافة جديدة ذات حلقة معقمة واستزاعها 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 الإحصائي Statistical analysis

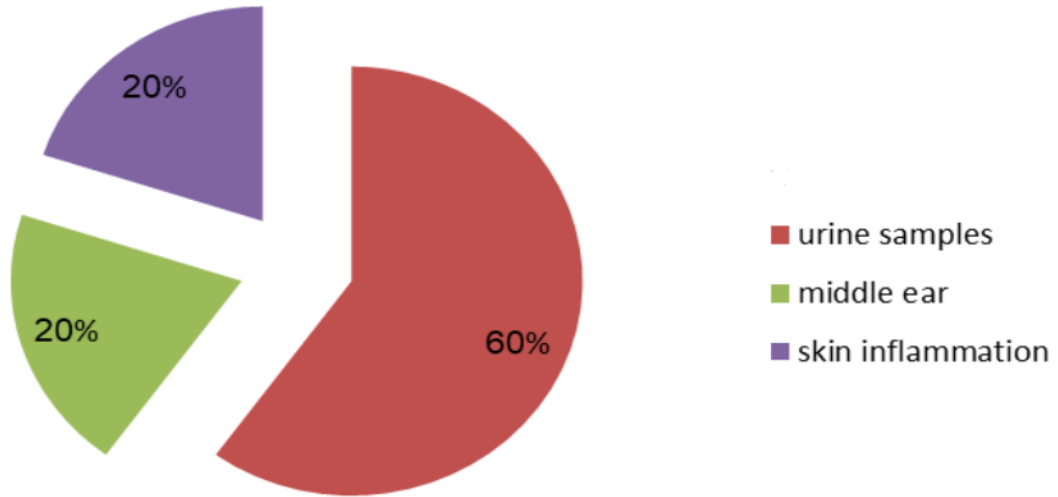
تم إجراء الاستقصاء الإحصائي باستخدام حزمة البرامج الإحصائية (IBM, SPSS V.23). تم تعريف البيانات إحصائيا في ترتيب التكرارات (عدد الحالات) والتكرارات النسبية (النسب المئوية). تم حساب ارتباط بيرسون الأقل أهمية عند $p < 0.01$ و $p < 0.05$.

النتائج والمناقشة

العزل و التشخيص المظهري لبكتيريا 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 شيوعاً 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 عفويًا أو ناتجاً عن عملية جراحية. تماماً 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 والطاقت 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 ، وتحديد 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 نسبياً من مسببات الأمراض الخارجية. تصطف قناة الأذن مع شمع الأذن الذي ينتج من الأذن التي تشكل حاجزاً

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 الكيميائية 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 إجراء العديد من الاختبارات الكيميائية التقليدية لمعرفة خصائص البكتريا. تم اختبار جميع عزلات البكتريا فأعطت نتيجة موجبة للكاتاليز (Catalase) واليوريز (Urease) والحركة (Motility) ، وتم إجراء اختبار الأوكسيديز (Oxidase) حيث أعطى الاختبار نتيجة سالبة، كذلك تم إخضاع جميع العزلات لاختبار IMVIC 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 الكيميائية 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 ، 2022، Schwartz). كذلك تمت مقارنة النتائج مع دراسة Fanar (2022)، حيث أعطت نتيجة موجبة لفحص Catalase وسالبة Oxidase، وعند إجراء اختبارات IMVIC فقد أعطت العزلات البكتيرية نتيجة سالبة لفحص Indol وموجبة لفحص Methyle red وسالبة لاختبار Vogas-Proskaur وموجبة لفحص Citrate utilization حيث يوصف مصدر وحيد للكربون حيث تغيير الوسط من الأخضر الى الأزرق نتيجة تغيير لون البروموثايمول الى اللون الأزرق لزيادة الاس الهيدروجيني. وتتفق أيضا مع (Kamil and Jarjes 2020). الذين أوجدا البكتريا في التهابات المسالك البولية.

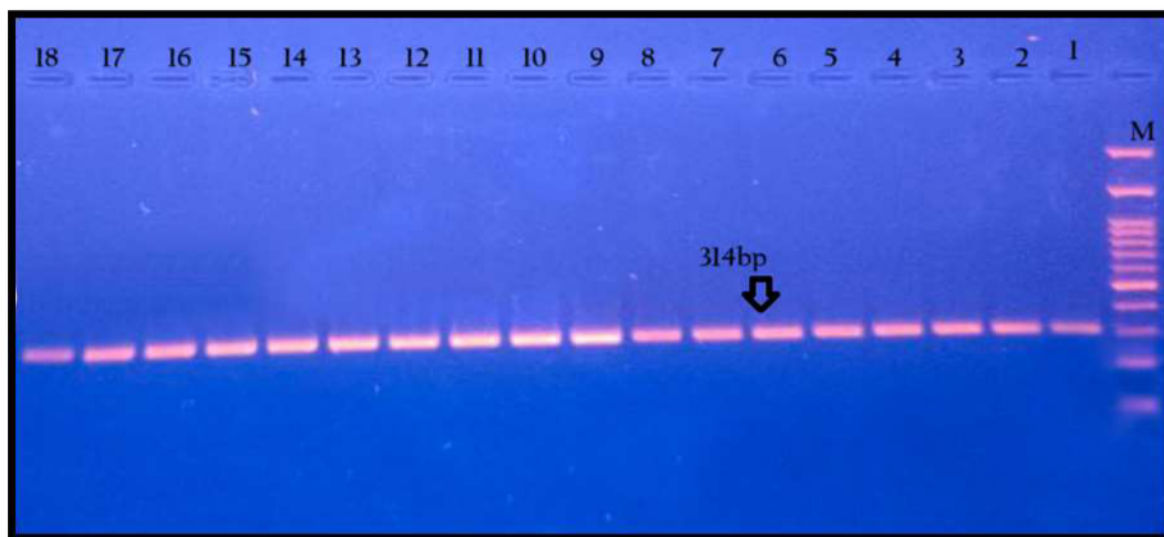
جدول (1): الخواص البكتريولوجية والكيميائية *p.mirabilis*

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 جزيئياً عن إنزيم اليوريز من خلال ظهور جين ureC المسؤول عن الصفات التشخيصية في بكتريا *P.mirabilis* حيث انتجت 18 عزلة جين ureC من مجموع 20 عزلة ونسبة (100%) من خلال استعمال بادي خاص بجين انتاج أنزيم اليوريز بعد تطبيق تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل على جميع العزلات وترحيلها كهربائياً فكانت النتيجة 18 عزلة انتجت جين أنزيم اليوريز من 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 إنتاج أنزيم البروتيز في دراستهم بنسبة 45%، ولا تتوافق أيضاً مع دراسة (et al.,2023) (Fadhela) حيث كانت نسبة إنتاج 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). أنزيم *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 تعقيداً من الأغشية الحيوية لأنه يعمل على إغلاق القسرة البولية وحماية البكتيريا من المضادات الحيوية، مما يؤدي إلى فشل العلاج. غالباً 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 الرائحة. 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 *Proteus mirabilis* IQD-No.1- IQD-No.10 المحلية وعزل *Proteus mirabilis* المرتبط وراثياً NCBI-BLAST:

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

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

الاستنتاجات

من خلال الدراسة نستنتج أن 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 جزيئياً عن أنزيم اليوريز من خلال ظهور جين *ureC* المسؤول عن الصفات التشخيصية في بكتيريا *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 اليوريز من 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 Integrins in Clinical *Proteus mirabilis* Isolates. *Infect Drug Resist*; 15:465-474.