European Journal of Research Development and Sustainability (EJRDS)
Available Online at: https://www.scholarzest.com
Vol. 5 No 03, March 2024
ISSN: 2660-5570

COMPARING THE GENE EXPRESSION LEVEL OF MOVEMENT OF *PROTEUS MIRABILIS* BACTERIA ISOLATED FROM URINARY TRACT INFECTIONS AND THE GENE EXPRESSION LEVEL OF ITS MOVEMENT FROM ISOLATES OF BURN AND WOUND INFECTIONS

Ali Abdullah Majeed[1]
Waqas Saadi Mahmood[2]
1,2 Dept. of Biology, College of Science, Tikrit University, Iraq.
Email1: aliabdullahmajeed202084@gmail.com *Email2*: w-s.mahmood@tu.edu.iq

Article history:

Received: 21st January 2024
Accepted: 11th March 2024

Abstract:

The current study aims to discover and compare gene expression levels of the (Motility) of (*proteus mirabilis*) bacteria which isolated from urinary tract infections and *proteus mirabilis* bacteria which isolated from burn infections and wounds by using the modern real-time PCR method. 16 isolates of *Proteus mirabilis* bacteria collected. There were 8 isolates of urinary tract infections and 8 isolates of burn and wound infections during 1-2-2023 to 1-6-2023 from Tikrit Hospital and outpatient clinics in Tikrit, these Isolates diagnosed based on microscopic examination and biochemical tests and confirmed by using strips API 20E System, and by using the Vitek-2 system, it become clear that all the isolates belong to *p.mirabilis* type, while all the 16 isolates of *p.mirabilis* have the ability to motility. The research results showed that the gene expression level of motility of *p.mirabilis* bacteria isolates that causes urinary tract infections is higher than the level of gene expression of motility of *p.mirabilis* bacteria that cause infection of burns and wounds.

Keywords: *proteus mirabilis,* Motility, Gene expression, UTI, wound and burn infections.

مقارنة مستوى التعبير الجيني لحركة بكتريا *proteus mirabilis* المعزولة من التهابات المجاري البولية ومستوى التعبير الجيني لحركتها من عزلات التهابات الحروق والجروح

علي عبد الله مجيد وقاص سعدي محمود
قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة تكريت، العراق.

الخلاصة: جاءت الدراسة الحالية بغية الكشف والمقارنة عن مستويات التعبير الجيني لحركة (Motility) البكتريا *proteus mirabilis* المعزولة من التهابات المسالك البولية و بكتريا *proteus mirabilis* المعزولة من التهابات الحروق والجروح باستخدام الطريقة الحديثة Real-time PCR، جمعت 16 عزلة لبكتريا *p.mirabilis* حيث جمعت 8 عزلات من التهابات المجاري البولية و 8 عزلات من التهابات الحروق والجروح خلال المدة 1-2-2023 الى 1-6-2023 من مستشفى تكريت والعيادات الخارجية في تكريت و شخصت بالاعتماد على الكشف المجهري و الاختبارات الكيموحيوية وتم تأكيد التشخيص بطريقة الاشرطة API 20E System و كذلك باستعمال نظام فايتك-2 اذ تبين ان كل العزلات تعود للنوع *p.mirabilis*. حيث امتلكت جميع العزلات ال 16 من بكتريا *p.mirabilis* القدرة على الحركة. ظهرت نتائج البحث ان مستوى التعبير الجيني للحركة لعزلات بكتريا *p.mirabilis* المسببة لالتهاب المسالك البولية هي اعلى من مستوى التعبير الجيني للحركة لعزلات بكتريا *p.mirabilis* المسببة لالتهابات الحروق والجروح.

1-المقدمة:

ان العالم Hauser يعد اول عالم مكتشـــف لبكتريا المتقلبات *proteus* في عام 1885 أذ انه تمكن من عزلها اول مره من البراز و مياه المجاري ولســبب تمكنها من ظاهرة تعدد الاشــكال pleomorphism فقد ســماها بالمتقلبات [1]، تنتمي بكتريا *proteus* الى العائلة المعوية Enterobaceriaceae والذي يميزها عن باقي افراد هذه العائلة انها تنتج انزيم Phenylalanine Deaminase [2]، وان جميع انواع ال *Proteus* موجبه لفحص الاندول ما عدا نوع *P.mirabilis* حيث انها تكون ســالبه لفحص الاندول وتكون موجبة لفحص اليوريا وكذلك تمتاز بإنتاجها لكميات كبيره لأنزيم اليورييز [3]، وان بكتريا *P.mirabilis* تكون على شــكل عصيات ســالبة لصــبغة كرام ودرجة حرارتها المثلى 37 مْ وذات تغذية كيميائية عضــوية Chemoorganotrophic وتحصــل عن طريق التنفس Respiration او التخمر Fermentation على الطاقة وتكون متحركة بأســواط محيطية Peritrichous flagella [4]، ان عملية الحركة في بكتريا *proteus mirabilis* تعد من اهم عوامل الضــراوة حيث ان بكتريا *P.mirabilis* تكون ثنائية الشــكل Dimorphic فهي قصــيرة

في المزارع السائل Broth Culture و تمتلك (6-8) اسواط و تعرف بالخلايا الخضرية Vegetative cells او بالخلايا السابحة Swimmer cells ولكنها في المزارع الصلبة Solid culture media فسرعان ما تصبح متطاولة و تمتلك اسواط عديدة Hyper flagellated لتعرف بالخلايا الانثيالية Swarmer cells [5]، يعتبر انزيم اليوريز الذي تنتجه بكتريا *proteus mirabilis* من عوامل الضراوة حيث يحتوي على مجموعة النيكل nickel و يعمل هذا الانزيم على تحليل اليوريا Urea الى Co2 وNH3 وبهذا ترتفع قاعدية الادرار الذي يقوم بتسهيل عملية تكوين بلورات الاباتيت Apatite و السترافيت Struvite و الكاربونيت Carbonate وهذه في دورها تتجمع لتكون الحصى في المجاري البولية لتحمي البكتريا من المضادات الحيوية [6]، تسبب العديد من الامراض للإنسان اذا وجدت في مناطق اخرى مثل الجهاز البولي و الاذن الوسطى و الجروح والحروق و السائل المخي الشوكي[7]، تحتل اصابات المسالك البولية المرتبة الثانية في سرعة الانتشار بعد اصابات الجهاز التنفسي وانها واسعة الانتشار [8]،ان الجلد هو الطبقة التي تغطي وتحمي الجسم من المؤثرات الخارجية وهو خط الدفاع الاول للجسم من مسببات الامراضية الميكروبية ومع ذلك فان المكروبات يمكن ان تدخل الية وتخترقه من خلال فواصل جلدية غير واضحة [9]، إن حالة غزو الاحياء المجهرية الممرضة للجسم المستهدف وردة فعل الانسجة تجاه هذه الكائنات الغازية لها وما تنتجه من ذيفانات قد ينتج عن كل ذلك ظهور تأثيرات ضارة في الانسجة التي تم غزوها من قبل هذه الممرضات مثل تكوين قيح والتهابات [10]، للجروح تعاريف كثيرة اذ يمكن ان تعرف انه اي فصل او قطع في استمرارية الجلد وقد يكون هذا الضرر بسبب بيولوجي او ميكانيكي او فيزيائي او كيميائي مما يسمح للميكروبات من الدخول الى الجسم والانسجة [11]، ان اصابات الحروق هو تعرض الجلد الى عوامل غير طبيعية كالتعرض للتيار الكهربائي او الحرارة او الاصابات الكيميائية او عوامل اخرى مما ينتج عنها حدوث تحطم في طبقة الجلد [12]، بسبب تزايد التهابات المجاري البولية و التهابات الحروق والجروح بسبب بكتريا *P.mirabilis* وللقدرة الكبيرة على الحركة في هذه البكتريا التي هي من عوامل الضراوة هدفت هذه الدراسة لقياس نسب التعبير الجيني للحركة (Motility) لبكتريا *P.mirabilis* المسببة لالتهابات المجاري البولية و مقارنتها مع نسب التعبير الجيني للحركة (Motility) لبكتريا *P.mirabilis* المسببة لالتهابات الحروق والجروح باستخدام التقنية الحديثة Real Time polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

2- عزل وتشخيص بكتريا *proteus mirabilis*

جمعت 16 عزلة بكتيرية من مصادر سريرية من بكتريا *proteus mirabilis*، تضمنت الدراسة 8 عزلات من التهابات المسالك البولية (UTI) و8 عزلات من التهابات الحروق والجروح من مستشفى تكريت التعليمي والعيادات الخارجية في تكريت، زرعت جميع العزلات على وسط اكار الدم Blood agar المجهز من شركة Acumedia/LAB (UK) ووسط اكار الماكونكي MacConkey agar المجهزة من شركة Himedia (India) ثم حضنت الاوساط الزرعية هوائيا لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 مْ.

3-الاختبارات الكيموحيوية:

تم اجراء الاختبارات الاتية (فحص الكتاليز Catalase، فحص الاوكسيديز Oxidase، الاندول Indole، احمر المثل Methyl Red، فوكس- بروسكاور Voges Proskauer، اختزال السترات Citrate Utilization) كما جاء في [13]، وكذلك شخصت باستعمال فحص API 20E System Biomerieux (france) التي تكون على شكل اشرطة وكل شريط يحتوي على 20 اختبار كيموحيوي مصغرة، وتكون سريعة و امنة و سهلة الاداء وكذلك شخصت باستعمال نظام الفايتك 2 (Vitek-2) لتأكيد تشخيص عزلات بكتيريا *p.mirabilis*.

1-3 اختبار التحري عن الحركة للبكتريا Motility

تم التحري عن قابلية بكتريا *p.mirabilis* على الحركة و زرعت مستعمرات البكتريا المعنية بالدراسة بطريقة التخطيط على اوساط اكار الدم Blood agar بمستعمرة فتية، ثم حُضِنتْ الاطباق بدرجة حرارة 37مْ ولمدة 24-48 ساعة، فنلاحظ إنتشار النمو خارج حدود التخطيط او ما يسمى بظاهرة العج Swarming فتكون النتيجة ايجابية.

2-3 استخلاص الحامض النووي الرايبي RNA RNA extraction with TRIzol

تم استخلاص الحامض النووي الريبي من العزلات البكتيريا باستخدام TransZol Up Plus RNA Kit المصنعة بواسطة (TransGen Biotech) الصيني وتم الاستخلاص حسب البروتوكول الشركة المصنعة ويجب أن تكون جميع الأدوات وألانابيب و eppendroff خالية من RNase، من الضروري تحويل الحامض النووي الرايبي mRNA الى الحامض النووي التكميلي cDNA لان الحامض النووي الرايبي mRNA يتحلل بسهولة وبسرعة اثناء الاستخدام لذلك من الصعب التعامل مع mRNA في المختبر, في هذه الدراسة تم نسخ mRNA بشكل عكسي الى cDNA التكميلي باستخدام EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix وتم تنفيذ الاجراء حسب تعليمات الشركة المصنعة (TransGen Biotech) الصيني، تم إجراء Real-time PCR وتم قياس مستويات التعبير الجيني عن طريق قياس دورة العتبة threshold cycle (Ct) باستخدام مكونات 2x qPCR Master Mix Kits الصيني المنشأ وتم اجراء quantitative Real-time PCR ((qPCR)، تم تجهيز البوادئ من برنامج Primer 3 plus وتم اعتماد الجين (*recA*) كجين مرجعي (Housekeeping gene) و كذلك الجين (ZA25) الذي يعبر عن الحركة (Motility) كما موضح في (الجدول 1)، وتم حساب التعبير الجيني كما جاء [14]، حسب المعادلة:

$\Delta CT = CT\ (gene) - CT\ (house\ keeping\ gene)$

$\Delta\Delta CT = \Delta CT\ Treated - \Delta CT\ Mean\ Control$

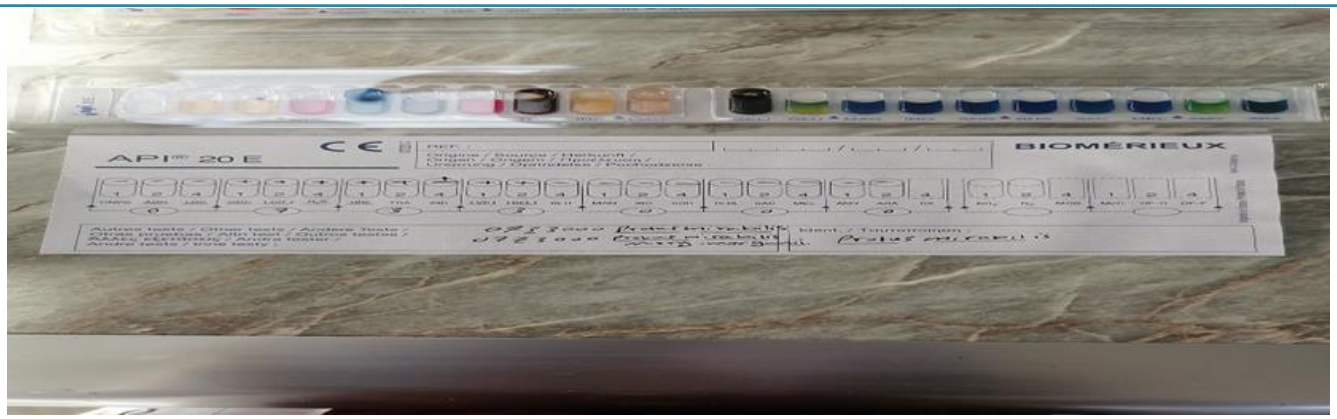
$Mean\ Folding = 2^{\Delta\Delta CT}$

جدول (1): البادئات المستخدمة للتعبير الجيني

No.	Primer Name	Foreword Sequence	Reverse Sequence
1	ZA25	TAGGCGTGCAAATCAATAGC	AGTAAATGGCCCAGGTGGTA
2	recA (Housekeeping gene)	GAGAGGAGGTGAGAGCCAAA	TGGGCAGTGAAGCATAAAGA

4- النتائج والمناقشة:

اعتمادا على الخصائص المزرعة على وسط الماكونكي واكار الدم الاساس تبين ان جميع العزلات البكتيرية تعود للجنس *proteus*، اذ بينت النتائج الاختبارات الكيموحيوية كما موضح في (الجدول 2) ان 16 عزلة كلها تعود لبكتريا *proteus mirabilis*، وكذلك تم تأكيد التشخيص بأشرطة فحص API 20E System كما مبين في (الشكل 1) وكذلك باستخدام جهاز فايتك-2 وكانت النتائج مطابقة 100%.



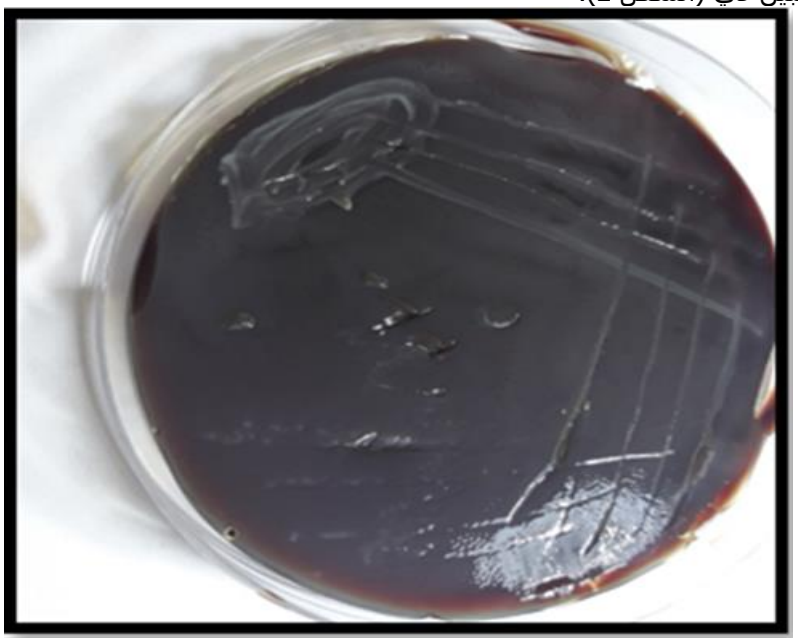
الشكل (1): فحص API 20E System

جدول2: الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests لعزلات بكتريا *p.mirabilis*

العزلات البكتيرية	العدد	Indole	M.R.	Oxidase	Catalase	V.P.	Citrate
P.mirabilis	16	-	+	-	+	-	+

نتيجة سالبة: - ، نتيجة موجبة: + **M.R.:**Methyle Red, **V.P.:**Voges Proskauer,

واظهرت نتائج فحص الحركة ان جميع عزلات بكتريا *proteus mirabilis* المأخوذة من التهابات المجاري البولية والتهابات الحروق والجروح كانت متحركة كما مبين في (الشكل 2).



الشكل (2): حركة بكتريا *proteus mirabilis* على وسط اكار الدم

لغرض دراسة التعبير الجيني لجين (AZ25) الذي هو احد الجينات المسؤولة عن الحركة تم اللجوء الى تصميم البادئ بالاعتماد على المعلومات من موقع المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية NCBI تم اجراء عملية التفاعل البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي RT-Qpcr وتم حساب قيم CT ٠ من جميع العزلات المأخوذة من اصابات المسالك البولية وكذلك من اصابات الحروق والجروح وبالاعتماد على الجين المرجعي (recA) كما موضح في (الجدول 3) لنتائج التهابات الحروق والجروح و(الجدول 4) لنتائج التهابات المسالك البولية وكذلك ظهور منحنيات قيمة حد العتبة CT كما مبين(الشكل 3)، وجد ان اعلى تعبير جيني قد ظهر من جميع العزلات هو في عزلات (اصابات التهاب المسالك البولية) في العزلة (BB8) بقيمة Folding تساوي (3.97581327) وحيث كانت هذه العزلة مقاومة لكل المضادات الحيوية ماعدا المضاد الحيوي التي كانت حساسة له هو (Azithromycin) بينما كانت اقل نسبة Folding موجودة من مجموع كل العزلات في التهابات الحروق والجروح (AA4) التي كانت قيمتها (0.018857079) حيث كانت مقاومة لثمانية من المضادات الحيوية و حساسة لاربعة من المضادات الحيوية، وقد ظهرت نتائج المتوسط الحسابي لل(Folding) لجميع عزلات البكتريا المسببة (لالتهاب الحروق والجروح) الذي كانت قيمته هي (Mean folding=1.822089) وهو اقل من المتوسط الحسابي لل(Folding) لعزلات البكتريا المسببة لالتهابات المجاري البولية الذي كانت قيمة (Mean folding=2.587198) وهذا يدل على ان إمراضيتها وحركتها تكون في التهابات المجاري البولية اكثر من التهابات الحروق والجروح.

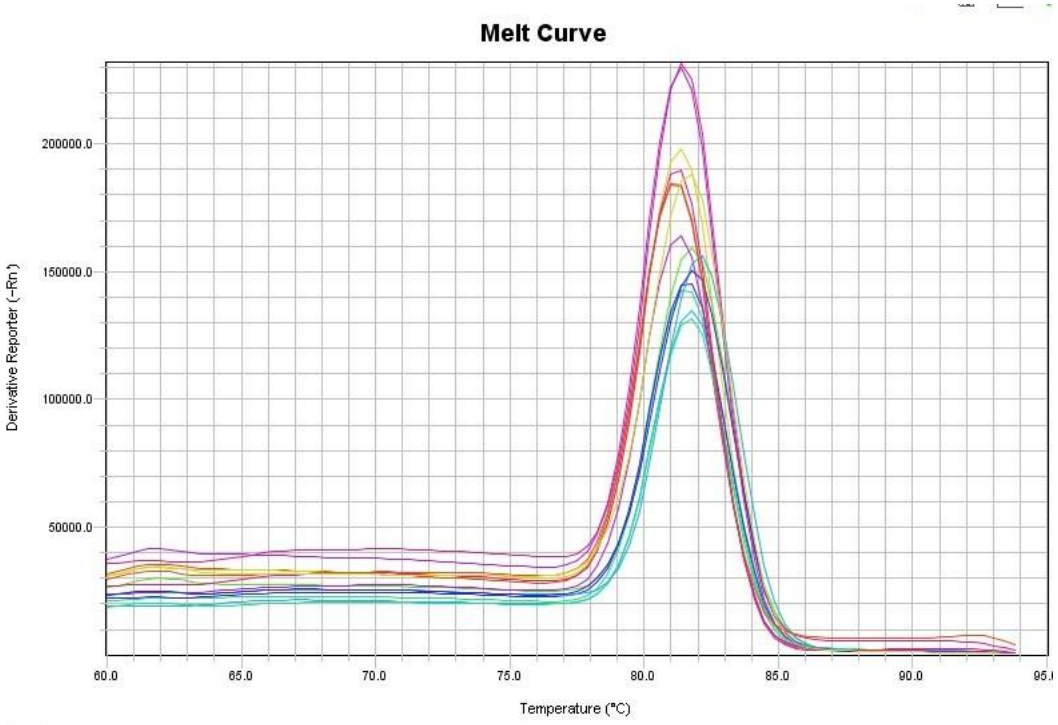
الجدول (3): قيم (Mean folding) لـ (Motility) لبكتريا *proteus mirabilis* المسببة لالتهابات (الجروح والحروق)

Sample	ZA25	Ref.recA	**ΔCt**	**ΔΔCt**	Folding
AA1	7.65	13.85	-6.2	1.57125	2.971620739
AA2	11.35	17.96	-6.61	1.16125	2.236511226
AA3	9.67	16.31	-6.64	1.13125	2.190484491
AA4	8.47	21.97	-13.5	-5.72875	0.018857079
AA5	8.27	15.63	-7.36	0.41125	1.329837532
AA6	9.13	17.86	-8.73	-0.95875	0.514502503
AA7	9.99	17.34	-7.35	0.42125	1.339087283

AA8	7.11	12.89	-5.78	1.99125	3.97581327
Mean control			-7.77125		1.822089

الجدول (4): قيم (Mean folding) للـ (Motility) لبكتريا *proteus mirabilis* المسببة لالتهابات المسالك البولية.

Sample	ZA25	Ref.recA	**ΔCt**	**ΔΔCt**	Folding
BB1	10.21	17.28	-7.07	-0.32125	0.800376104
BB2	9.55	20.02	-10.47	-3.72125	0.075821458
BB3	8.28	13.27	-4.99	1.75875	3.384047925
BB4	7.59	11.82	-4.23	2.51875	5.730853434
BB5	8.16	17.50	-9.34	-2.59125	0.165941887
BB6	10.23	15.09	-4.86	1.88875	3.703142329
BB7	8.52	17.53	-9.01	-2.26125	0.208591171
BB8	7.12	11.14	-4.02	2.72875	6.628810451
Mean Control			-6.74875		2.587198



الشكل (3): يبين ال (Melt curve) للجين (Motility)

4-الاستنتاجات:

يدل على ان حركة بكتريا *proteus mirabilis* ومستوى التعبير الجيني للحركة في التهابات المجاري البولية أكثر من مستويات التعبير الجيني للبكتريا في التهابات الحروق والجروح.

5-المصادر References

1- O'Hara, C. M., Brenner, F. W., Steigerwalt, A. G., Hill, B. C., Holmes, B., Grimont, P. A., ... & Brenner, D. J. (2000). Classification of Proteus vulgaris biogroup 3 with recognition of Proteus hauseri sp. nov., nom. rev. and unnamed Proteus genomospecies 4, 5 and 6. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *50*(5), 1869-1875.

2- Levinson, W. (2016). Review of medical microbiology and immunology,14th Edition., McGraw-Hill education, Inc.

3- Angela, M. J.; Lockatell, V.; Johnson, D. E.; Mobely, H. L. (2003). The relationship between Proteus mirabilis and urinary tract infection. J. infec. and Immu. 71(6): 367-361.

4- Garrity, G. (2007). *Bergey's manual® of systematic bacteriology: volume 2: the Proteobacteria, part B: the Gammaproteobacteria* (Vol. 2). Springer Science & Business Media.

5- Różalski, A., Torzewska, A., Moryl, M., Iwona, Kwil, I., Maszewska, A., Ostrowska, K., Drzewiecka, D., Zablotni, D., Palusiak, A., Siwinka, M., & Staczek, (2012). Proteus sp.–an opportunistic bacterial pathogen–classification, swarming growth, clinical significance and virulence factors. Folia Biologica et Oecologica, 8, 1.

6- Abdel-Baky, R. M., Ali, M. A., Abuo-Rahma, G. E. D. A. A., & AbdelAziz, N. (2017). Inhibition of urease enzyme production and some other virulence factors expression in Proteus mirabilis by N-acetyl cysteine and dipropyl disulphide. *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health: Volume 7*, 99-113.

7- **الطريا, رنا خالد احمد غائب.** (2002). تأثير بعض المستخلصات النباتية في نمو جرثومتي *Proteus mirabilis* و*Pseudomonas aeruginosa* المعزولتين من مناطق مختلفة من جسم الانسان. رسالة ماجستير. جامعة الموصل/ كلية التربية.

8- Cantón, R., Loza, E., Aznar, J., Castillo, F. J., Cercenado, E., Fraile-Ribot, P. A., ... & SMART-Spain Working Group. (2019). Monitoring the antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms involved in intraabdominal and

urinary tract infections recovered during the SMART study (Spain, 2016 and 2017). *Revista Española de Quimioterapia*, *32*(2), 145.

9- Gerard, J. T., Berdell, R. F., & Christine, L. C. (2016). Microbiology an Introduction.12TH. 21, 580-581.
10- Gupte, S. (1994). Short Text Book of Medical microbiology 6th ed. Jaypee Brothers Medical Dublishars (P) Ltd., India.
11- O'dell, M.L. (1998). Skin wound infections an over view American family physicio.
12- Ekrami, A. and Kalantar, E. (2007). Bacterial infections in burn patients at burn hospital in Iran. Indian J. Med. Res., 126: 541-544.
13- Forbes, B. A., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (2007). *Diagnostic microbiology* (pp. 288-302). St Louis: Mosby.
14- Dumas, J. L., Van, D. C. A., & Perron, K. (2006). Analysis of antibiotic resistance gene expression in Pseudomonas aeruginosa by quantitative real-time-PCR. FEMS Microbiology Letters, 254(2),217–225.
15-