The Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and

Scientific Research

University of Mosul / College of Science

Department of Biology

# Molecular Investigation of Virulence and Resistance Genes in Proteus mirabilis Isolated from Urinary tract Infections in Mosul City / Iraq

**Mohammed Abdulrazzaq Ibraheem Husan Alqatan**

Ph.D. Thesis

**Biology /Microbiology**

**Supervised By**

**Asst. Prof.**

**Dr. Rayan Mazin Faisal Al-Obaidy**

**1446 A.H.** **2024 A.D.**

## Acknowledgment

First of all, I thank God Almighty, the King of Kings, for the success and for all the blessings He bestowed upon me, including the blessing of completing this thesis despite the difficult circumstances that accompanied me during this journey. May my blessings and peace be upon my master, the most honorable creation of God, our master Muhammad, and upon all his family and companions. After that, I am pleased to extend my sincere thanks, gratitude and great respect to my supervisor, Asst. Prof. Dr. Rayan Mazin Faisal, for accepting to supervise this thesis, for his valuable scientific comments and guidance, and for his continuous follow-up, which had a great impact on the completion of this thesis in the way it appears today.

I would also like to extend my sincere thanks and gratitude to the Deanship of the College of Science, represented by Professor Dr. Hiyam Adel Al-Taie, and to the Head of the Biology Department, Professor Dr. Raed Salem Al-Saffar and Professor Dr. Amjad Abdel Hadi for providing all the facilities and equipment necessary for this work. Finally, words are not enough to express my love and appreciation for my father and mother. And to my wife and children and to everyone who was with me at all times. Thank you to all my friends who stood with me, Dr. Anmar Al-Taie ,Ethar, Mahmoud, Ayad , Dr. Talal,Rafal, Mohammed Mosto and Younis Al Joary . and to everyone who stood with me, my endless thanks to all of you, my friends.

***Mohammed A. Alqatan***

## الخلاصة

تم عزل ما مجموعه 37 سلالة *Proteus mirabilis* من 420 عينة بول من المرضى الذين يراجعون عدة مستشفيات في الموصل / العراق خلال الفترة (من ديسمبر 2022 إلى أبريل 2023). تم تحديد العزلات على أساس الاختبارات الزرعية والمجهرية والكيميائية الحيوية، وتم تأكيدها أيضًا عن طريق التسلسل الجيني للرنا الرايبوسومي 16S rRNA. تم تقديم تسلسل الحمض النووي لـ 27 سلالة إلى المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) كسلالات محلية جديدة تنتمي إلى *P. mirabilis*. أظهرت الحساسية للمضادات الحيوية ضد 18 مضاد حيوي أن *P. mirabilis* كان عالي المقاومة للأموكسيسيلين (100%)، يليه التريميثوبريم (97.29%)، في حين تم الكشف عن انخفاض معدل المقاومة ضد السيبروفلوكساسين والنورفلوكساسين (13%)، الإيميبينيم (8%) والميروبينيم. (5%). أظهر تحليل الحمض النووي البلازميدي أن 21 من أصل 37 سلالة من *P. mirabilis* تحتوي على بلازميدات، وسلالتان تحتويان على بلازميدتين و19 سلالة تحتوي على بلازميد واحد.

تم استخدام أربع مجموعات من البادئات لتجارب PCR. تضمنت المجموعة الأولى البادئات المستخدمة للتعرف على ستة مناطق وراثية وهي (*CITM*، *DHAM*، *ACCM*، *EBCM*، *FOXM*، *MOXM1*). أظهرت النتائج أن 85.71% من العزلات حملت FOXM على بلازميداتها و14.28% حملت *MOXM* و4.76 % حملت *CITM*. ومع ذلك، لم يتم الكشف عن *DHAH*، و*ACCM*، و*EBCM* على البلازميدات. المجموعة 2 بما في ذلك جينات *zapA*، و*ireA* (مستقبل حامل الحديد)، و*hpmA* (الهيموليزين)، و*mrpA*، fimbriae)). تم اكتشاف *ZapA* في 80.95% من بلازميدات *P. mirabilis*، يليه *ireA* بمعدل 76.19%، و*hpmA* بنسبة 14.28%، و*mrpA* بنسبة 4.76%. المجموعة 3 بما في ذلك *CTXG1*، *CTXG9 CTXG2*، *CTXG8* و*CTXG25*. وأظهرت نتائجها أن CTX9 كان أعلى جين تم اكتشافه بنسبة 76.19%، يليه CTXG1 بنسبة 71.42%، في حين تم اكتشاف *CTXG2* و*CTXG8* و*CTXG25* فقط على الكروموسوم. وأخيراً، تم العثور على الجينات المسببة للأمراض *PmIJ1* و*qnrD* على بلازميدات *P. mirabilis* بنسبة 52.38% و47.61% على التوالي. أظهرت النتائج الحالية أن البلازميدات تنتشر بشكل متزايد بين العزلات المحلية السريرية لبكتيريا *P. mirabilis*، ويلزم اتخاذ احتياطات جدية.

تم اختبار أحد عشر مستخلصًا مائيًا وكحوليًا من النباتات الطبية الطبيعية وأربعة جسيمات نانوية لتأثيرها المثبط ضد *P. mirabilis*. أظهرت نتائجنا أن المستخلصات المائية والكحولية للسماق والقرفة كانت الأقوى في قدرتها على تثبيط نمو السلالات المختارة بمعدل 100 ملغم/مل. من ناحية أخرى، كان التركيز المثبط الأدنى لجسيمات الفضة النانوية 2000 مايكروغم / مل، بينما كان التركيز المثبط الأدنى لجسيمات $SiO_2$ و$TiO_2$ والبنتونيت النانوية 8000 مايكروغم / مل. تم اختبار دور التركيز تحت المثبط الادنى للمستخلصات النباتية و والجسيمات النانوية لتأثيرها ضد بعض الجينات المسؤلة عن الفوعة باستخدام تفاعل البلمرة الكمي اللحظي. أظهرت نتائجنا أن المستخلص المائي للسماق كان قادراً على تثبيط التعبير عن جميع الجينات التي تم اختبارها، وهي *flhB*، و*flhD*، و*rsbA*، و*zapA*، و*hpm*، في *P. mirabilis*. ومع ذلك، فإن المستخلص المائي للقرفة لديه القدرة على خفض تنظيم اثنين من *flhB* و*flhD*، في حين يزيد من التعبير عن *rsbA*، *zapA*، و*hpm*. كانت البنتونيت فقط قادرة على منع التعبير عن *flhB* و *flhD* و *rsbA* و *zapA* و *hpm*. تسببت جميع الجسيمات النانوية الأخرى قيد الدراسة في زيادة التعبير الجيني للجينات التي تم فحصها مقارنة بعينات التحكم غير المعالجة.

تم اختيار العزلة البكتيرية التي أظهرت قدرة عالية على التجمع ونسبة مقاومة عالية للمضادات الحيوية لإجراء تسلسل البلازميدات الخاصة بها. تم إيداع التسلسل البلازميد الكامل لسلالة *P. mirabilis* MoRay12 في NCBI Global GenBank لأول مرة محليًا تحت اسم pRM2023 ومنحه رقم تسلسلي CP135988. أظهر تحليل تسلسل pRM2023 أن حجم البلازميد المستعاد كان 8419 قاعدة نيتروجينية ويحمل الجينات المسؤولة عن مقاومة الأمينوغليكوزيد والأمينوسيكليتول والتتراسيكلين.

تم اختيار جينوم العزلة البكتيرية التي أعطت أعلى نسبة مقاومة للمضادات الحيوية واحتوت على أكبر عدد من جينات الفوعة لتسلسل الجينوم الكامل. يتكون جينوم *Proteus mirabilis MORAY37* من 4.131.367 قاعدة نيتروجينية وتم إيداعه في DDBJ/ENA/GenBank تحت رقم تسلسلي NZ_JAWUZK000000000.1. كان إجمالي تسلسل ترميز البروتين 3844 CDSs، وكان عدد جينات الحمض النووي الريبي 75 RNA. حددت شجرة التصنيف التطوري لـ *Proteus mirabilis MORAY37* باستخدام خادم TYGS أقرب سلالات النوع كانت *Proteus mirabilis ATCC* 29906. تظهر نتائج isDDH أن قيمة isDDH من *Proteus mirabilis MORAY37* هو ≥89٪، أعلى من الحد الأدنى، مقارنة بسلالة النوع *Proteus mirabilis ATCC 29906*، وهذا يشير

إلى أن تسلسلي الجينوم مرتبطان بقوة وينتميان إلى نفس النوع. تم التعرف على جينات مقاومة المضادات الحيوية المكتسبة من *P. mirabilis MORAY37* في الجينوم باستخدام CARD. أظهرت النتائج أن هناك حوالي 10 جينات في جينوم *P. mirabilis MORAY37* تمنح مقاومة للأمينوغليكوزيدات والفلوروكينولونات والمونوباكتامات والسيفالوسبورين والكلورامفينيكول والسلفوناميدات.

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

# التحري الجزيئي عن جينات الفوعة والمقاومة في بلازميدات Proteus mirabilis المعزولة من التهاب المجاري البولية في مدينة الموصل / العراق

محمد عبدالرزاق ابراهيم حسن القطان

اطروحة دكتوراه

علوم الحياة / احياء مجهرية

باشراف

الاستاذ المساعد الدكتور ريان مازن فيصل

1446هـ 2024م