جامعة الموصل
كلية العلوم

دراسة تشخيصية وجزيئية على جرثومة الملوية البوابية *Helicobacter pylori* المعزولة من اصابات القرحة المعدية

ايمان يوسف ذنون عبدالله ألنعيمي

اطروحة دكتوراه

بإشراف
أ.د. أميرة محمود الراوي

1438هـ **2017م**

الخلاصة

أولت الدراسة الحالية اهتماماً بالتحري عن جرثومة الملوية البوابية *Helicobacter pylori* من مرضى القرحة المعدية والمعوية ضمن مدينة الموصل للفترة ما بين منتصف تشرين الثاني من عام 2013 ولغاية حزيران من عام 2014 واستؤنف العمل في مدينة اربيل ما بين تشرين الثاني من عام 2015 لغاية ايلول من عام 2016 ولكلا الجنسين لفئات عمرية مختلفة تراوحت ما بين 10–75 سنة. جمعت 60 خزعة نسيجية من المعدة مستأصلة بالناظور من قبل طبيب إختصاص واعتمدت الطرق الروتينية واختبار اليوريز السريع في العزل الذي أظهر كفاءة في الكشف عن وجود الجرثومة في 41 خزعة نسيجية، واعطيت نتائج افضل في الزرع الروتيني حيث عزلت 44 عزلة لجرثومة *H.pylori* من المرضى قيد الدراسة. كما تم التحري عن مستضد الجرثومة من الخروج واظهرت نتائج موجبة عند 34 من أصل 100 عينة خروج .

درست قدرة جرثومة *H.pylori* على التحولات الشكلية في ظروف تحضين مختلفة وأبدت امكانية التحول من الشكل العصوي الى الشكل الكروي .

استحدثت طريقة جديدة لزرع جرثومة *H.pylori* التي بالإمكان استخدامها للزرع الروتيني اليومي للحصول على نمو وفير من الجرثومة خلال 48 ساعة وأمكن استخدامها بنجاح في عزل الجرثومة وفحص الحساسية للمضادات الحيوية بظروف تحضينCO_2 وبدرجة حرارة 37 °م .

تم تحوير وسط مولر هنتون يوريا أكار الانتقائي بإضافة الهيمين بتركيزين 10 ملغم /سم^3 و 20ملغم /سم^3 وابدى الوسط المضاف له 20ملغم /سم^3 كفاءة عالية في العزل مقارنة بوسط مولر هنتون يوريا اكار المحور بتركيز 10 ملغم/سم^3 ووسط نقيع المخ والقلب يوريا اكار المحور. كما أن التحضين بظروف محبة للهواء القليل وCO_2 يعطي افضل نمو لجرثومة *H.pylori* مقارنة بالظروف اللاهوائية .

وفي محاولة أولى على المستوى المحلي تم الكشف الجزيئي عن جرثومة *H.pylori* باعتماد تقنيةNested- PCR وباستخدام بادئات متخصصة للجين 23S rRNA المسؤول عن مقاومة المضاد الحيوي Clarithromycin، كما أظهرت البادئات خصوصية للجرثومة *H.pylori* عند مقارنتها مع الجراثيم *Klebsiella pneumoniae* و *Escherichia coli* و *Staph aureus* وتم تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية للـDNA (DNA sequencing) لعزلتين بالبادئ المتخصص لتسلسل للجين 23S rRNA وبينت النتائج تثبيت تسلسل جديد للقواعد النتروجينية للجين المذكور لأول مرة في العراق.

أثبت فحص الحساسية للمضادات الحيوية كفاءة المضاد الحيوي Ciprofloxacin بنسبة حساسية 100% يعقبها المضادات الحيوية Norfloxacin و Clarithromycin و Gentamicin حيث أبدت حساسيتها بنسب 92.3% و 86.4% و 80.8%على التوالي وبالمقابل كانت اعلى نسبة مقاومة للمضادين الحيويين Metronidazole و Amoxicillin والتي بلغت69.2% و 65.4%على التوالي فضلا عن المضادات ذات المقاومة المتوسطة والتي تتمثل بالمضادات Erythromycin و Tetracycline و Rifampicin وبنسب مقاومة 34.6% و،38.5% و 42.3%على التوالي .

درست الفعالية التثبيطية لعدد من المواد الطبيعية على نمو جرثومة *H.pylori* وقياس التركيز المثبط الادنى Minimum Inhibition Concentration (MIC) حيث بلغ في قشر الرمان 0.0488 ملغم/سم^3 ومادة الكركم0.0976 ملغم/ سم^3 ومادة الزنجبيل 1.56 ملغم/سم^3 بينما لم يظهر خل التفاح، المستكي وزيت المستكي اي تأثير على الجرثومة.

University oF Mosul
College oF Science

Diagnostic and Molecular study of *Helicobacter pylori* isolated from Gastric ulcer

A Thesis

Submitted to the council of Biology Department/ College of Science as a partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of philosophy of Doctorate in Biology / Microbiology

By

Eman Yousif Thanoon AL-Noaimi

To

Supervised by professor
Dr. Amera Mahmood Al-Rawi

2017 A.D **1438 A.H**

Abstract

Current study rewarded attention to investigate the bacterium *Helicobacter pylori* from patients with gastric and intestinal ulcer within Mosul city from the period of middle of November 2013 until June 2014. The study was resumed working in Erbil from November 2015 until September 2016 for both sexes of the categories of different ages which were ranged of 10-75 years old 60 biopsy tissues were collected from the stomach laparoscopic by jurisdiction doctor and adopted routine methods with rapid urease test. It showed the efficiency of the rapid urease test in the investigation of *H.pylori* with efficient in detecting presence of 41histological biopsy and was given the best results in terms of culture routine for 44 isolates of *H.pylori* of patients under study. It was investigating the germ antigen from patient's stool and showed positive results for 34 out of 100 stool samples.

It was studied the ability of *H.Pylori* to morphological changes in circumstances different incubations and expressed the possibility of shape changing from bacillary to form spherical shape. It was Introduced a new process of culturing the *H.Pylori* which can be used for the daily routine culture for an abundant growth of germ within 48 hours. This method could be used successfully to isolate the germ, antibiotic sensitivity assay and simplest possibilities for incubation conditions of CO_2 and temperature 37°C.

It was modulating Mueller Hinton urea selective agar by adding 10mg/ cm^3 and 20mg/ cm^3 of haemen. The media of 20mg/ cm^3 of adding haemen showed high efficiency of isolation compared to Mueller Hinton urea agar with concentration of 10mg/ cm^3 of haemen and for infusion brain and modulate heart urea agar. Beside the incubation

conditions of microaerobic CO_2 which gave the best growth of *H.Pylori* compared to anaerobic conditions.

For the first attempt at the local area, it was detected of *H.Pylori* using Nested PCR technique and using specialized primers for 23SrRNA gene is responsible for resistance to the Clarithromycin that specificity for *H.Pylori* when compared with the bacteria (*Klebsiella pneumonia*, *E.coli* and *staphylococcus aureus)* and determined the DNA sequences for 2 isolates using the primers of 23SrRNA gene and this result was applied for the first time in Iraq.

This study has proved efficient to examine sensitivity of Ciprofloxacin by 100%, followed by Norfloxacin, Clarithromycin and Gentamycin as shown sensitivity proportions 92.3%, 86.4% and 80.8, respectively. On the other hand, it was showed the highest resistance to Metronidazole and Amoxicillin were to 69.2% and 65.2%, respectively, as well as the medium resistance antibiotic with Erythromycin, Tetracycline and Rifampicin with proportions 34.4%, 38.5% and 42.3% respectively.

It was studied the effectiveness of inhibitory to a number of natural materials on growth of *H.Pylori* and measuring the minimum inhibition concentration (MIC) for the Pomegranate peel 0.0488 mg/ cm^3, turmeric 0.0976 mg/ cm^3 and ginger substance 1.56 mg/ cm^3, while apple vinegar, mistake and mistake oil did not appear any affect to the bacteria.