جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الموصل / كلية العلوم

قسم علوم الحياة

الكشف عن المجتمع البكتيري بتقنية الميتاجينوم والتحري عن البكتيريا المرضية Mycoplasma و Ureaplasma المعزولة من النساء في مدينة الموصل

سارة بدري محمود علي الجماس

رسالة ماجستير

علوم الحياة / احياء مجهرية

إشراف

الاستاذ الدكتورة

أميرة محمود محمد الراوي

1446هـ 2024 م

الخلاصة:

اولت الدراسة الحالية اهتماما بالتحري عن بكتيريا المايكوبلازما *Mycoplasma* واليوريابلازما *Ureaplasma* حيث تم أخذ 152 عينة من المسحات المهبلية من قبل طبيبات النسائية الاختصاص باستخدام مسحات معقمة و المنظار من النساء في مدينة الموصل المراجعات لمستشفى الخنساء التعليمي ومستشفى البتول والعيادات الخارجية الأخرى. تم جمع العينات من النساء المصابات بالالتهابات المهبلية والعقم والمعرضات للاجهاض والولادة المبكرة و اللواتي يستخدمن اللولب Intrauterine device(IUD) ولم يستخدمن المضادات الحيوية، والتي تبلغ اعمارهن ما بين 17-60 سنة وبشكل اكثر وضوحا شملت الدراسة تحديد البيئة الميكروبية باستخدام التحليل الميتاجينومي Mitogenomics Next-generation sequencing (NGS) وقد أظهرت نتائج التحليل تبايناً في عدد البكتيريا الموجودة في بيئة المهبل، حيث وجد أن هناك 23 نوعاً مختلفاً من البكتيريا، بعضها يعتبر بكتيريا طبيعية normal flora أو بكتيريا ممرضة، بما في ذلك المايكوبلازما واليوريابلازما.

تم عزل بكتريا المايكوبلازما واليوريابلازما وتشخيصها باستخدام طرائق الزرع الروتينة على وسط pleupneumo like organism (PPLO) والفحص المجهري باستخدام صبغه كمزا Giemsa stain والاختبارات الكيموحيوية حيث تظهر اليوريابلازما نشاط اليوريز Urease مما يميزها عن أنواع المايكوبلازما في حين تمتاز المايكوبلازما بقابليتها على تخمر سكر الكلوكوز اما اليوريابلازما ليس لها القدرة على تخمر السكريات، والعزلات البكتيرية للمايكوبلازما واليوريابلازما لم تظهر أي قدرة على انتاج انزيم الكتاليز catalase وانزيم الاوكسديز oxidase، اما الكشف عن عوامل الضراوة فقد اظهرت جميع العزلات البكتيرية للمايكوبلازما واليوريابلازما غير منتجة لانزيم الهيمولايسين فيما امتلكتا المايكوبلازما واليوريابلازما القدرة على انتاج انزيم البروتيز Protease.

أظهرت النتائج ان المجموع الكلي للمسحات الموجبة 79 مسحة(52%) المأخوذة من النساء المصابات بالالتهابات المهبلية والعقم والولادة المبكرة و الاجهاض والمستخدمات IUD بينما كانت المسحات السالبة 73 مسحة (48%) تباينت نسب المسحات بين الحالات التي تم اخذ المسحات منها حيث بلغت نسبة المسحات الماخوذة من النساء المصابات بالالتهابات المهبلية 47% بينما كانت نسبة المسحات للنساء المصابات بالعقم 40% فيما بلغت نسبة المسحات للنساء اللاتي حصل لهنَّ ولادة مبكرة 60% وبلغت اعلى نسبة للعينات الموجبه لحالات الإجهاض 70% بينما كانت نسبة النساء اللاتي يستخدمن وسيلة مانع الحمل IUD 43%. تراوحت اعمار النساء اللواتي شملتهن الدراسة مابين

(17-60) سنة المعرضات لاصابات الجهاز التناسلي من التهابات مهبليه والاجهاض والولاده المبكرة والعقم ومستخدمي IUD، حيث بلغت اعلى نسبة اصابة للمايكوبلازما كانت للاعمار مابين (28-38) سنة بنسبة 22.2%(8) واليوريابلازما بنسبه 56%(31) في حين كانت اقل نسبة إصابة للمايكوبلازما كانت للاعمار مابين (50-60) سنة بنسبة 11.1%(2) واليوريابلازما بنسبه 33%(6) ونسبه الاعمار (17-27) بلغت المايكوبلازما 5.45%(3) واليوريابلازما 50% (18)، ونسبة النساء(39-49) كانت نسبة المايكوبلازما 11.6% (5) واليوريابلازما56% (24).

تضمنت الدراسة في الجانب الجزيئي استخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) Polymerase chain reaction للتحري عن وجود المايكوبلازما من خلال استهداف جزء محدد من جين *16SrRNA* وجين *rceA*، والتحري عن جينات *Urease* للكشف عن اليوريابلازما وتم تسجيل عزلات محليه جديدة مقارنة مع العزلات العالمية المسجلة في موقع بنك الجينات العالمي National Center for Biotechnology Information(NCBI) دراسة لأول مرة.

كما تناولت الدراسة في احد جوانبها التحري عن مقاومه كل من المايكوبلازما واليوريابلازما لبعض المضادات الحيوية اذ ظهرت العزلات البكتيرية مقاومة شديدة للمضاد الحيوي Erythromycin ولم يظهر لها تأثيراً على العزلات المدروسة وبنسبة 100% بينما أبدت حساسية عالية تجاه المضاد الحيوي Tetracyclineوبنسبة 100% للمايكوبلازما وبنسبة 50% لليوريا بلازما اما المضاد الحيوي Doxycycline فكانت المايكوبلازما واليوريابلازما مقاومة اتجاه المضاد وبنسبة 50% والمضاد الحيوي Chloramphenicol،Azithromycin فكانت نسبة المقاومه لهذه المضاد لعزلات المايكوبلازما واليوريابلازما بنسبة 50% والمضاد الحيوي Ciprofloxacinبنسب متفاوتة كما أظهرت احدى العزلات المسجلة في موقع NCBI باسم SAMA3 متعددة المقاومة للمضادات لأول مرة.

Abstract:

The current study paid attention to investigate *Mycoplasma* and *Ureaplasma*, as 152 samples of vaginal swabs were taken by specialized gynecologists using sterile swabs and speculum from women in Mosul city,who attending Al-Khansa Teaching Hospital, Al-Batoul Hospital, and other outpatient clinics. Samples were collected from women suffering from vaginal infections, infertility, and those at risk of miscarriage and preterm birth,and who used an intrauterine device (IUD) and did not use antibiotics. Their ages were between 60-17 years. More clearly, the study included determining the microbial environment using metagenomic analysis (Mitogenomics Next-generation Sequencing) (NGS) analysis results showed variation in the number of bacteria present in the vaginal environment, as it was found that there are 23 different types of bacteria, some of which are considered normal flora or pathogenic bacteria, including *Mycoplasma* and *Ureaplasma*.

Mycoplasma and *Ureaplasma* were isolated and diagnosed using routine culture methods on PPLO (pleupneumo like organism) medium, microscopic examination using Giemsa stain, and biochemical tests, where *ureaplasma* shows urease activity, which distinguishes it from *Mycoplasma* species, while *Mycoplasma* is distinguished by its ability to ferment glucose, while *Ureaplasma* does not. It has the ability to ferment sugars, and the bacterial isolates of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* did not show any ability to produce catalase or oxidase enzyme. As for the detection of virulence factors, all bacterial isolates of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* showed that they did not produce hemolysin, while *Mycoplasma* and *Ureaplasma* had the ability to produce the protease enzyme.

The results showed that the total number of positive swabs was 79 (52%) taken from women with vaginal infections, infertility, preterm birth, miscarriage, and IUD users, while the negative swabs were 73 (48%). The percentages of swabs varied between the cases from which the swabs were taken, as the percentage of swabs was taken from women with vaginal infections was 47%, those from women with infertility was 40%, the percentage of swabs from women who had preterm birth was 60%, and the highest percentage of positive samples for miscarriages was 70%, while the percentage of women who

used an IUD contraceptive method was 43%.The ages of the women included in the study ranged between (17-60) years, and they were exposed to infections of the gential system, such as vaginal infections, miscarriages, preterm birth, infertility, and IUD users. The highest rate of infection with *Mycoplasma* was for those aged between (28-38) years, was 22.2% (8) and *Ureaplasma*, at a rate of 56% (31), while the lowest percentage of infection with *Mycoplasma* was for ages between (50-60) years, at a rate of 11.1%(2), and for *Ureaplasma*, at a rate of 33%(6), and the percentage of ages (17-27) reached 5.45%(3), and for *Ureaplasma*, it was 18(50%),and the percentage of women was 39-49. The percentage of *Mycoplasma* was 5 (11.6%) and *Ureaplasma* was 24(56%).

On the molecular side, the study included the use of polymerase chain reaction (PCR) to detect the presence of *Mycoplasma* by targeting a specific *16SrRNA* gene and the *rceA* gene, and investigating the *Urease* genes to detect *Ureaplasma*. New local isolates were recorded and compared with global isolates registered on the Global GenBank website National Center for Biotechnology Information (NCBI).

In another aspects, the study also investigated the resistance of both *Mycoplasma* and *Ureaplasma* to some antibiotics, as the bacterial isolates showed high resistance to Erythromycin, as it did not appear to have an effect on the studied isolates, at a rate of 100%, while *Mycoplasma* and *Ureaplasma* showed high sensitivity to Tetracycline, at a rate of 100% and 50% respectively, as for Doxycycline, *Mycoplasma* and *Ureaplasma* were resistant to 50%, while for Azithromycin and Chloramphenicol, the rate of resistance was 50% for *Mycoplasma* and *Ureaplasma* isolates, and Ciprofloxacin at varying rates, as one of the isolates registered on the NCBI website under the name SAMA3 showed multiple resistance to those antibiotics.

The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
University of Mosul / College of Science
Department of biology

Detection of the bacterial community using metagenomic technique and investigation of pathogenic Mycoplasma and Ureaplasma isolated from women in Mosul city

Sarah Badri Mahmood Ali Al-Jamas

M.Sc. /Thesis

Biology / Microbiology

Supervised by

Prof. Dr. Amera Mahmood Mohammed Alrawi

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