جامعة الموصل

كلية العلوم

التشخيص الجزيئي لمجموعة "Red Complex" من إلتهاب أنسجة حول الأسنان المزمن وتأثير مادتين طبيعيتين على بعض جوانب إمراضيته

سمية عدنان صالح محمد الحمدوني

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة / الأحياء المجهرية

باشراف

الأستاذ

الدكتورة أميرة محمود محمد الراوي

1441 هـ ***2020 م***

الخلاصة:

صممت الدراسة الحالية كأول دراسة محلية في مدينة الموصل لعزل وتوصيف الأنواع الثلاثة لممرضات المعقد الأحمر من مزيج مجتمع بكتريا اللاهوائية المتواجدة في أنسجة حول الأسنان وتشخيصها بطريقة جزيئيةحديثة إذ جمعت 30 عينة لسائل اللثة من جيوب حول الأسنان بعمق ≤ 4 ملم ذات اصابة مزمنة من المرضى المرتادين الى المستشفى التعليمي في كلية طب الاسنان في جامعة الموصل. حضرت ثلاث أنواع من الأوساط لزرع العينات Schaedler Anaerobe Agar، *Tannerella forsythia* (TF) agar و Trypton Yeast extracts Gelatin Volatile Fatty acids and Serum (TYGVS) agar. بعد 4– 7 أيام من التحضين اللاهوائي عزلت الأشكال المختلفة من المستعمرات وأجري لها زرع ثانوي لاجل التنقية الروتينية والتشخيص باستخدام طريقة تشخيص الجزيئي الحديثة Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP). وصفت العزلات البكتيرية المؤكدة بطريقة LAMP بالخصائص المظهرية وتكوينها للغشاء الحيوي الأحادي ومتعدد البكتريا في الصفيحة العيارية Microtitter plate. أظهرت النتائج ان ممرضات المعقد الاحمر الثلاث امكن تشخيصها من نفس العينة وقد اظهرت تباين في الخصائص المظهرية لنفس العزلة وانها كونت غشاء حيوي احادي ومتعدد الانواع بنمط تآزري.

تحرت الدراسة الحالية ايضا عن أسهل وأسرع طريقة لاختبار قدرة نوعين من المواد الطبيعية، اللبان والشب، ونوعين من المضادات القياسية، Ciprofloxacin (CIP) و Chlorhexidine (CHX) في التاثير على عدة جوانب تتعلق بامراضية ممرضات انسجة حول الأسنان. تم تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) لهذه المواد الاربع ونمط تداخل عملها. واظهرت النتائج الى أن أسهل وأدق الطرق كانت طريقة Resazurin- based microdilution. سجلت المواد الأربعة قيم MIC مختلفة على انواع البكتريا الثلاث وسجل المستخلص المائي الخام للمواد الطبيعية قيم أكبر من مضادات البكتريا القياسية. أبدت المواد الأربعة فعالية تثبيط تآزري ضد ممرضات المعقد الاحمر الثلاث.

كما تحرت الدراسة أيضا عن كفاءة المواد الطبيعية لمنع حدوث ظاهرة التجمع بين ممرضات المعقد الأحمر وقد ثبت أن تراكيز 2– 12 ملغم/ مل من هذه المواد تمنع حدوث هذه الظاهرة.

تم تقييم تأثير المواد الأربعة على نمو متعدد أنواع المايكروبات من الخلايا والغشاء الحيوي لممرضات المعقد الأحمر. وقد أبدت هذه المواد الأربعة تثبيط نمو متعدد أنواع المايكروبات من الخلايا لكن بمعنوية أقل من ذلك لنمو أحادي النوع كما أنها تتداخل مع تكوين الأغشية الحيوية الأحادية النوع وإن تأثير المواد، عدا ذلك للبان، يكون ضعيف على الأغشية الحيوية متعددة الأنواع.

إستخدمت دراستنا الصبغات الفلورسنية لعدة القياس LIVE/ DEAD BackLight Bacterial Viability kit للتمييز بين البكتريا الحية والميتة بعد معاملة متعدد أنواع الميكروبات من الخلايا

والغشاء الحيوي بالمواد الأربعة. تبين النتائج أن المعاملة لمدة ساعة بكل المواد ،عدا مضاد CIP، كانت فعالة لفقدان حيوية متعدد أنواع المايكروبات من الخلايا لكن ليس الغشاء الحيوي.

كما هدفت الدراسة تصميم تجربة لصنع بوليمر من المواد المضادة للبكتريا بإستخدام فلم اللبان شبيه القرص واختبار قدرته على تحرير المواد المضادة بطريقة الإنتشار بالطبق. وفقت الدراسة في صنع هذا الفلم الذي أثبت قدرته على تحرير المواد المضادة للبكتريا وتكوين منطقة تثبيط النمو.

ولأول مرة محليا، تمكنت الدراسة الحالية من تصنيع علك طبي من اللبان وإختبار فائدته العلاجية على عدد من المصابين بإلتهاب انسجة حول الأسنان المزمن . تم تتبع تثبيط البكتريا بقياس مستوى الإنزيمات المحللة في سائل اللثة بإستخدام نظام APIZYM system. وقد أثبت علك اللبان الطبي كفاءته في إختزال الحمل المايكروبي لممرضات أنسجة حول الاسنان بدلالة قلة مستويات الإنزيمات المحللة لهذه الممرضات في سائل اللثة للمشاركين الذين إستخدموا العلك الطبي مقارنة مع عينة السيطرة المعالجين فقط بالتنظيف الميكانيكي لجيب السن.

Abstract

The current study was designed as the first one in Mosul City to isolate and characterize the three species of red complex pathogens from the mixed population of periodontal anaerobes and identify them by a new molecular method as thirty samples of gingival fluid were obtained from periodontal pockets with ≥ 4mm depth suffering from chronic periodontitis in patients attending the Teaching Hospital- College of Dentistry at the University of Mosul. Three types of media were prepared for culturing the samples on, Schaedler Anaerobic Blood Agar; *Tannerella forsythia* (TF) Agar and Trypton Yeast extracts Gelatin Volatile fatty acids and Serum (TYGVS) Agar. After 4-7 days of anaerobic incubation, colonies with different morphologies were picked and are subcultured for routine purification and molecular diagnosis by the new Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) technique. Confirmed isolates by LAMP were more characterized by phenotypic features and their mono- and polymicrobial biofilms were formed in a microtitter plate. The results showed that the three pathogens of red complex were identified in the same specimen and great variations in the phenotypic characters of the same isolate were noticeable. The three pathogens were also able to form mono- and poly-bacterial biofilms in a synergistic mode.

The current study also searched more rapid and easier methods for testing the ability of two natural materials, olibanum and alum and two standard antibacterial agents, Ciprofloxacin (CIP) and Chlorhexidine (CHX) to inhibit many aspects in the pathogenicity of these periodontopathogens. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of these four antibacterial agents was determined and the manner of interaction between these four agents was studied. The results showed that the easiest method was resazurin- based microdilution. The four agents recorded different MIC values on the three types of bacteria and the MICs of the aqueous crude extract of the two natural materials were higher

than that of the standard antibacterial agents. The four agents showed synergistic inhibitory effect against the three types of red complex pathogens.

The study also investigated the efficacy of the natural materials to prevent coaggregation between red complex pathogens and it is proved that 2- 12 mg/ ml concentrations prevented this phenomenon.

The effect of the four antibacterial agents on the mono- and polymicrobial growth of red complex pathogens and biofilm formation was also estimated. They inhibited the polymicrobial growth but with less significant than that on the monomicrobial growth and interfered with the formation of homotypic biofilms but their activity, except that of olibanum, reduced on polymicrobial biofilms.

The study also utilized the fluorescent dyes of LIVE/ DEAD BackLight Bacterial Viability kit to differentiate between live and dead bacteria after treating the polymicrobial plankton and mature biofilm with the four antibacterial agents. The results showed that exposure for one hour to all agents, except CIP, was effective to loss cell viability but not effective against the mature polymicrobial biofilm.

Another goal of this study was to design an experiment to make a polymer of antibacterial agents using disk- like film of olibanum and investigate its ability to liberate the antibacterial agents by agar diffusion method. The study successfully made this film which maintained its ability to liberate the antibacterial agents and form an inhibition zone.

For the first time locally, this study was successfully able to manufacture a Medicated Chewing Gum (MCG) from olibanum and test its therapeutic activity in several participants infected with chronic periodontitis. Bacterial inhibition was followed by tracking the hydrolytic enzymes' level of periodontal pathogens in the gingival crevicular fluid (GCF) using APIZYM system. The manufactured olibanum- MCG proved its efficacy in reducing the bioburden of periodontal pathogens in term of diminishing the levels of hydrolytic enzymes in the GCF in

University of Mosul

College of Sciences

Molecular Identification of "Red Complex" Group from Chronic Periodontitis and the Effects of Two Natural Materials on Some of its Pathological Aspects

Sumaya Adnan Salih Muhamad Al-Hamdoni

Ph.D. Thesis

Biology / Microbiology

Supervised by

Prof Dr. Amera Mahmmod M. Al-Rawi

2020 A.D. ***1441 A.H.***