Medical Research Institute
Department of Molecular and Diagnostic Microbiology

Detection of A2142G and A2143G Mutations in Clarithromycin Resistant *Helicobacter pylori* Strains among Children in El- Shatby University Hospital, Alexandria

A Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science

In

Molecular and Diagnostic Microbiology

Presented by

Heba Hesham El Sayed Abd Allah

B. Sc. of Pharmaceutical Sciences, 2013
Faculty of Pharmacy and Drug Manufacturing
Pharos University

2019

RUA Library
Central Medical Library (B)
Faculty of :
Serial No : 691
Classification : 616

ABSTRACT

Background: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a spiral bacteria which colonize the stomach affecting almost 50% of the world's population. *H. pylori* infections are usually associated with gastritis, peptic ulcer disease, and the development of gastric adenocarcinoma. Clarithromycin is considered as a cornerstone for *H. pylori* treatment, its use as first-line therapy regimen is endorsed by the current US and European guidelines. However, there has been a continuous decrease in its efficacy. Studies reported eradication rates below 75%. Clarithromycin resistance is considered the most important cause of eradication failure both in adults and children. Clarithromycin resistance is due to peptidyl transferase loop of the 23S rRNA mutations: A2142G, A2142C, and A2143G. These mutations are mainly responsible for more than 90% of Clarithromycin resistance cases. Our aim was to determine the prevalence of clarithromycin-resistance among *H. pylori* positive children with prior clarithromycin treatment.

Methodology: Fifty children were included. Inclusion criteria were: age: between one and fifteen years old, previously treated with clarithromycin based regimen for at least two weeks showing treatment failure as manifested by persistence of positive *H. pylori* stool antigen test as well as gastric symptoms. Careful instructions were given to children parents before undergoing endoscopy to stop any antibiotics or proton pump inhibitors for 4 weeks and 2 weeks respectively before performing the endoscopy. After obtaining an informed consent, multiple endoscopic gastric biopsies were collected mostly from the stomach's antrum. Specimens were then subjected to histopathological examinations, rapid urease test and molecular detection of clarithromycin resistance using Real-Time polymerase chain reaction (RT PCR) using Bosphore *H. Pylori* Genotyping Mix v1 ANATOLIA GENEWORKS® kit.

Results: Children aged between 7 - 12 years old represented the majority (70 %) showing female predominance (56%). The commonest reported symptoms were epigastric abdominal pain (50%) and hematemesis (28%), while the most common endoscopic findings were erythema (100%) followed by antral nodularit (78%). Rapid urease test was positive in (74%) of the cases. *H.pylori* bacterium was seen attached to the epithelium in (92%) of the specimens. Molecular detection of clarithromycin resistance showed that 20

out of 32 (62.5%) positive *H. pylori* cases were wild type representing the most common genotype, followed by 2143A-G single mutation in 8/32 (25%) cases. Double mutations (2142A-C & 2143A-G) were detected in only 4 (12.5%) cases. However, in 18 (36%) cases *H. pylori* could not be detected (true negativity as internal control of the test was amplified). Statistical significant correlation existed between both rapid urease test and PCR results as well as histopathological findings and PCR test results ($p < 0.001$).

Conclusion: Wild type *H. Pylori* was most common genotype found. The prevalence of clarithromycin mutations could be linked to the overuse of macrolides in Egypt. Multiplex PCR offers a real benefit in the identification of clarithromycin susceptible genotypes along with clarithromycin-resistant ones. Negative PCR result could suggest that more point mutations should be searched for as an explanation for such result.

المستخلص العربى

الخلفية العلمية: تعد الباكتيريا الحلزونية واحدة من الباكتيريا سلبية الصبغ للجرام ، ذات طبيعة ميكروفيلية (اى تحتاج فقط لهواء قليل). عادة ما تستعمرهذه الباكتيريا الجهاز الهضمى و خاصة المعدة. تقريبا ٥٠% من سكان العالم مصابون بهذه البكتيريا. عادة ما تقترن هذة الباكتيريا بعوامل تزيد من شراستها بعض هذة العوامل يساعدها فى الالتصاق و القيام بمستعمراتها و البعض الاخر يساعدها فى الحاق الضرر بالانسجة. ذلك يساعد هذة الباكتيريا فى تكوين بعض الامراض الخاصة بالجهاز الهضمى مثل اتهاب و قرح المعدة و سرطان المعدة. كما انها تساهم ايضا فى بعض الامراض الاخرى خارج الجهاز الهضمى مثل امراض جهاز القلب و الاوعية الدموية ، و الجهاز العصبى و التنفسى و بعض امراض الدم. لم يتم معرفة الطريقة الفعلية لانتقال هذه الباكتيريا حتى الان و لكنه يعتقد انها تنتقل بطرق مباشرة و غير مباشرة. تنقسم الطرق التشخيصية لهذه الباكتيريا الحلزونية استنادا إلى كيفية الحصول على العينة ومعالجتها الى طرق اجتياحية و اخرى غير اجتياحية. فالطرق الاجتياحية عاداة ما يتم فيها اخذ عينات عن طريق المنظار. قد تم وضع نظم مختلفة لعلاج الباكتيريا الحلزونية منها خطوط علاج دوائية اولى و ثانية و ثالثة استنادا على المقاومة للكلاريثروميسين. عندما تكون نسبة المقاومة لهذا المضاد الحيوى قليلة، فيعد العلاج الثلاثى المكون من الكلاريثروميسين هو العلاج الامثل. حاليا الباكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية فى ازدياد و مقاومة الكلاريثروميسين تعتبر سببا فى فشل علاج هذه الباكتيريا. الطفرات جينية فى مواقع A2143G, A2142G وA2142C تشكل تقريبا ٩٠% من طرق لمقاومة الباكتيريا للكلاريثروميسين.

الطريقة العلمية: خمسون طفلا قد تم ادراجهم فى هذة التجربة خلال ١٥ شهرا. هؤلاء الاطفال قد سبق تشخيصهم بعدوى الباكتيريا الحلزونية عن طريق تحليل البراز و قاموا بأخذ دواء الكلاريثروميسين ضمن برنامجهم العلاجى. حيث تم سحب عينات من انسجة المعدة عن طريق الفحص بالمنظار فى قسم المناظير بمستشفى الشاطبى الجامعى فى الاسكندرية. قد تم سحب عدد من العينات من المعدة حيث انها المكان الذى تنمة فيه الباكتيريا الحلزونية بكثرة و ذلك للقيام بفحص الانسجة بالصبغة، و القيام باختبار اليورياز السريع و ايضا اختبار حساسية الباكتيريا للكلاريثروميسين باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل

النتائج: من الخمسون عينة المدرجة فى التجربة، ٧٤% اعطوا نتائج ايجابية باستخدام اختبار اليتورياز السريع. اما عند القيام بصبغ الانسجة وجد ان الباكتيريا الحلزونية قد تم رؤيتها فى ٩٢% من العينات. بالنسبة لاختبار حساسية الباكتيريا للكلاريثروميسين باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل ، ٢٠ من ٣٢ عينة (٦٢.٥%) وجدوا قابلين للعلاج بالكلاريثروميسين و قد شكلوا النسبة الاكبر. يليه وجود طفرة جينية واحدة فى الموقع 2143A-G قد شكل ذلك (٢٥%). و قد تم لعثور على طفرات مزدوجة فى المواقع 2142A-C و 2143A-G فى ٤ من الحالات فقط بنسبة (١٢.٥).

الاستنتاج: ان انتشار طفرات الكلاريثروميسين فى هذة الدراسة يعود الى الاستخدام المفرط لمجموعة المضادات الحيوية (المكروليدز). الى جانب ان تفاعل البوليميراز المتسلسل له فوائد فى التعرف على الباكتيريا القابلة للعلاج بالكلاريثروميسين و الباكتيريا المقاومة له. فبالتالى تفاعل البوليميراز المتسلسل يعد كحل بديل عن زراعة الباكتيريا عندما تكون غير ممكنة. بالاضافة الى ان النتائج السلبية التى تم العثور عليها فى هذة الدراسة تحفز البحث عن طفرات جينية اخرى فى الباكتيريا الحلزونية المقاومة للباكتيريا.

الملخص العربى

تعد الباكتيريا الحلزونية واحدة من الباكتيريا سلبية الصبغ للجرام شيوعا، ذات طبيعة ميكروفيلية (اى تحتاج فقط لهواء قليل). عادة ما تستعمر هذه الباكتيريا الجهاز الهضمى و خاصة المعدة. تقريبا نصف سكان العالم مصابون بهذه البكتيريا. و هى تعتبر من احدى المسببات لبعض الامراض الخاصة بالجهاز الهضمى مثل اتهاب و قرح المعدة و سرطان المعدة. كما انها تساهم ايضا فى بعض الامراض الاخرى خارج الجهاز الهضمى مثل امراض جهاز القلب و الاوعية الدموية، و الجهاز العصبى و التنفسى و بعض امراض الدم.

لا يعرف حتى الان الطريقة الفعلية لانتقال هذه الباكتيريا و لكنه يعتقد انها تنتقل بطرق مباشرة و غير مباشرة. من اكثر طرق الانتقال المباشرة هى عن طريق البرازي فموي او الفموي فموي كما ان الطريق المعدى فموى قد يساهم ايضا فى الانتقال المباشر. اما الطعام و الماء فتعد من الطرق الغير مباشرة لانتقال هذة الباكتيريا.

تنقسم الطرق التشخيصية لهذه الباكتيريا الحلزونية استنادا إلى كيفية الحصول على العينة ومعالجتها الى طرق اجتياحية و اخرى غير اجتياحية. الطرق الاجتياحية عاداة ما يتم فيها اخذ عينات عن طريق المنظار و يتم تحليلها اما عن طريق زراعة الباكتيريا او الفحص النسيجى للعينة او باستخدام فحص اليورياز السريع (RUT) او عن طريق تفاعل البوليميراز المتسلسل(PCR) .اما عن الطرق الغير اجتياحية فلا تحتاج لاخذ عينات بالمنظارو تعتمد على تحليل العينة عن طريق الاختبارات المصلية او فحص الزفير باليوريا (UBT) او البحث عن مولد المضاد فى البراز(SAT).

و قد وضعت نظم مختلفة لعلاج الباكتيريا الحلزونية منها خطوط علاج دوائية اولى و ثانية و ثالثة استنادا على المقاومة للكلاريثروميسين. عندما تكون نسبة المقاومة لهذا المضاد الحيوى قليلة، فيعد العلاج الثلاثى المكون من الكلاريثروميسين هو العلاج الامثل.

حاليا الباكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية فى ازدياد و مقاومة الكلاريثروميسين تعتبر سببا فى فشل علاج هذه الباكتيريا. حيث ان الكلاريثروميسين يقوم بوظيفته عن طريق الامساك بجزء 23S الرِّنا الرِّيباسِيّ (rRNA) الذى يعد جزءا من 50S الوحدة الفرعية للريبوسوم وفبالتالى ذلك يؤدى الى قمع نشاطه وبالتالي يكبح تركيب البروتين.

تقريبا ٩٠% من طرق مقاومة الباكتيريا للكلاريثروميسين هى عن طريق طفرات جينية فى مواقع A2143G, A2142GوA2142C. من طرق المقاومة ايضا هى ترجمة و تفعيل بعض من المضخات البروتينية.

و قد كان الهدف من هذة الرسالة هو تحديد معدل مقاومة الباكتيريا الحلزونية للكلاريثروميسين بين اطفال مستشفى الشاطبى التابعة لجامعة الاسكندرية. قد تم تجميع خمسون عينة من اطفال قد سبق تشخيصهم بعدوى هذه الباكتيريا عن طريق تحليل البراز بعد انتهاء العلاج المحتوى على الكلاريثروميسين و قد تم ذلك خلال ١٥ شهرا.

معظم العينات قد اخذت من اطفال اعمارهم كانت بين ٧-١٢ سنة (٧٠%) و كان معظمهم اناثا(٥٦%).اكثر اعراض الاطفال كانت الام المعدة (٥٠%) يليها القيء الدموي (٢٨%) و اكثرما لوحظ اثناء القيام بالمنظار ان كل ٥٠ طفلا كانوا يعانون من التهاب فى المعدة(١٠٠%)يليها وجود درن فى المعدة(٧٨%).

معظم العينات كانت نتائجها ايجابية عند القيام باختبال اليورياز السريع(٧٤%) و ٤ عينات(٨%)فقط لم يتم تحديد البكتيريا فيهم عند القيام بالتشخيص النسيجى للعينات و صباغتها بال PAS.

اما بالنسبة لحساسية الباكتريا للكلاريثروميسين فكانت معظم العينات مستجيبة للمضاد الحيوى بنسبة (٦٢.٥%) يليها (٢٥%) للبكتيريا ذات الطفرة الجينية الواحدة 2143A-G ثم (١٢.٥) % للبكاتيريا ذات الطفرة الجينية المزدوجة. فى (٣٢ %) من الحالات لم يتم العثور على الباكتيريا مع العلم ان عبنة الضبط الداخلى قد تم مضاعفتها.

معظم حالات تفاعل البلمرة المتتسلسل PCR كانت نتائجهم ايجابية عند القيام بفحص اليورياز السريع (٩٣.٧٥%)، فى حين (٦١.١%) من العينات السلبية فى فحص اليورياز السريع اعطت ايضا نتائج سلبية عند القيام بتفاعل البلمرة النتسلسل و هذا ذات دلالة احصائية.

اما عند القيام بالفحص النسيجى للعينات فقد وجدت الباكتيريا فى (٩٢%) من الحالات منهم(٧٦%) كانت نتائجهم ايجابية بفحص اليورياز السريع و(٢٤%) كانت نتائجهم سلبية و هذا ليس له دلالة احصائية.

علاوة على ذلك معظم البكتيريا التى وجدت عند القيام بالفحص النسيجى للعينات كانت ايضا لها نتائج ايجابية عند القيام بتفاعل البلمرة المتتسلسل(٦٩.٦%)و ايضا كل حالات تفاعل البلمرة المتتسلسل السلبية لم يتم العثور فيها على البكتيريا عند صباغتها و فحصها نسيجيا.