P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2015 ,(9), (3) :177-184

(JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة

Open Access

الكشف عن الاصابة بالبكتريا الحلزونية H. pylori باستخدام الاختبار الجزيئي PCR بأستعمال جينات وعينات مختلفه في مجتمع مدينة الرمادي في محافظة الانبار.

ضحى عبد السلام عبيد* محمد قيس العاني* عصام محمد عبد الله**

*جامعة الانبار – كلية العلوم

** جامعة الانبار – كلية الصيدلة

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: ٢٠١٣/٠٠/٠٠
تاريخ القبول: ٢٠١٤/٥/٦
تاريخ النشر: / / ٢٠٢٢

DOI: 10.37652/juaps.2015.127642

الكلمات المفتاحية:

H. pylori،
PCR ،
محافظة الانبار.

الخلاصة:

استهدفت الدراسة الحالية الكشف عن الاصابة بالبكتريا الحلزونية البوابيه باستعمال الاختبار الجزئي (تفاعل الكوثره المتسلسل Polymerase chain reaction) لتحديد الجينات الاكفأ في التشخيص وتحديد العينة الاسهل في الاستخدام والاكفأ في التشخيص. إذ تم جمع 50 عينه مرضية من المرضى المراجعين لوحدة الناظور. وجُمِع من كل مريض عينات خزع نسيجية وعينة لعاب وبُراز وكذلك جمعت 30 عينة سيطرة من الاشخاص غير المصابين كتجربة ضابطة (control). بعد اجراء الاختبار الجزيئي وجد ان الاختبار الجزيئي لعينات الخزع النسيجيه هو المعيار الاكفأ إذ كانت نسبة الحساسية 86% والخصوصية 100% بالنسبة للجينات المستخدمه (VacA ,16srRNA)، والاختبار الجزيئي باستخدام عينات البراز كانت الحساسية والخصوصية عند أستخدام الجين 70 vacA% و100% على التوالي، اما عند استخدام الجين 16srRNA كانت الحساسية 72% وخصوصية 90%، اما الاختبار الجزيئي عند استخدام عينات اللعاب فلم تُظهر اي نتيجة موجبة.

المقدمة:

البكتريا الحلزونيه البوابية *(Helicobacter pylori)* هي بكتريا سالبة لصبغة غرام،حلزونية، متعددة الاسواط (٥-٧ سوط)، محبة للتهوية القليلة Microaerophilic. تستوطن الطبقة المخاطية اعلى الخلايا الطلائية المعدية في الانسان[1,2]. تصيب نصف سكان العالم تقريبا[3]. عزلت لاول مرة من قبل العالمين وارين ومارشال عام ١٩٨٣م [4]. سميت البكتريا الحلزونية البوابية في باديء الامر بأسم *Campylobacter pyloridis* ثم أُعيد تسميتها بأسم Campylobacter *pylori* اعتماداً على نظام التسمية العالمية، وفي عام 1989م بينت دراسات على جين 16SRNA الرايبوسومي مكنت الباحثين في الكشف بأن هذه البكتريا لم تعد تنسب الى الجنس *Campylobacter*، وتم وضعها في جنسها الصحيح وهو *Helicobacter* وأشتق اسم الجنس *(Helico)* من شكلها الحلزوني (اللولب)، واشتق اسم النوع *(Pylori)* من كلمة البواب اشارة الى البوابة المعدية من جهة الاثنى عشري .[5,6]أن البكتريا الحلزونية البوابية هي المسبب الرئيس لألتهاب المعدة (Gastritis) والقرحة الهضمية (Peptic ulcer)، وتطور سرطان المعدة (Gastric cancer) والسرطان اللمفاوي المعدي (MALT) lymphoma [7]، وقد أثبتت هذه البكتريا قدرتها على أحداث الاصابة من خلال بعض الدراسات،أذ وجدوا بأن القضاء على البكتريا الحلزونية البوابية لدى المرضى الذين يعانون من قرحة المعدة يمنع بشكل كبير تكرار المرض وكذلك يخفض خطر تطور سرطان المعدة [8].

تصنفها منظمة الصحة العالمية بأنها عامل مسرطن من الدرجة الاولى اعتمادا على نتائج الدراسات الوبائية [9]. تكون طرق الانتقال من شخص إلى آخر أما بالنمط فموي – فموي والذي يكون النمط الاكثر انتشارا في الدول المتطورة بسبب الازدحام الذي أدى الى أنخفاض الاحوال المعيشية وأنتشار العادات غير الصحية، أو بالنمط

* Corresponding author at: University of Anbar - College of Science .E-mail address: mohammedqais1975@yahoo.com

برازي– فموي والذي يكون النمط الاكثر وجودا في الدول النامية بسبب سوء النظافة وعدم التوعية الجيدة [10,11]، .يؤدي الوضع الصحي للعائلة دوراً كبيراً في عدوى هذه البكتريا [12]. يكون الغشاء المخاطي المعدي محصناً ضد الاصابات البكتيرية نظراً للحموضة العالية في تجويف المعدة، لكن جاءت البكتريا الحلزونية البوابية وأخلت بهذة القاعدة وتمكنت من استعمار الطبقة المخاطية المعدية بسبب أمتلاكها عدداً من الصفات الفريدة التي مكنتها من الدخول الى الطبقة المخاطية، كالحركة وأتخاذها حيزاً مكانياً في الطبقة المخاطية، والالتصاق بالخلايا الطلائية، الهروب من الاستجابة المناعية، كل هذا ساعد البكتريا الحلزونية البوابية على قدرتها في الاستعمار والانتقال [13]، وكذلك تمتلك هذه البكتريا العديد من عوامل الضراوة التي تكون مسؤولة عن أمراضية البكتريا، ومن هذة العوامل الجين المرتبط مع سمية الخلية (Cytotoxic associated gene antigen (cagA)) وهو العامل الاشد خطورة والذي يكون مسؤولاً عن تطور سرطان المعدة، ومن العوامل الأخرى هي الجين البادىء لقرحة الأثني عشري (Duodenal ulcer promoting gene (dupA))، وانزيم اليوريز وهو المسؤول عن معادلة الحموضة في تجويف المعدة، والاسواط المسؤولة عن الحركة [13]. والجين المكون للحويصلات (vacuolating cytotoxin gene (vacA)) وهو العامل المسؤول عن تكوين الحويصلات في الخلايا الطلائية التي تسبب تحطيم الخلايا الطلائية وبهذا يعد العامل المسؤول عن حدوث قرحة المعدة، وبهذا تعد البكتريا الحلزونية البوابية المسبب الرئيسي لألتهاب المعدة، وقرحة المعدة والاثني عشري، ومرتبطة مع حالات الورم اللمفي المعدي Gastric mucosa associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma وتطور سرطان المعدة Gastric cancer [14].

يعد تشخيص الاصابة بالبكتريا الحلزونية البوابية مهماً جداً، وان الاختبار الاختبار الجزيئي بطريقة التفاعل متعدد السلاسل (Polymerase chain reaction) هو الاختبار الاكثر كفأه والذي يمكن ان يصنف ضمن الطرق الغازية والطرق غير الغازية، أذ يستخدم الاختبار الجزيئي في الكشف عن وجود البكتريا الحلزونية البوابية في عينات مختلفة مثل عينات الخزع النسيجية (Biopsies) طرق غازية)، عينات البراز (Stool)، وعينات اللعاب (Saliva) (طرق غير غازية)[15]، تكون حساسية وخصوصية هذا الاختبار عالية وذات كفاءة جيدة في كشف الكميات القليلة للبكتريا الحلزونية البوابية عن طريق كشف قطع DNA لهذة البكتريا[17 , 16]. يسمح هذا الاختبار للباحثين واطباء المختبرات من الكشف عن الاصابة بالبكتريا الحلزونية البوابية في عينات صغيرة والتي تمتلك وجود عدد بكتيري قليل، ويكون اختباراً عالي الخصوصية وقد يكون اكثر حساسية من تقنيات التشخيص الاخرى المعتمدة على اخذ خزع نسيجية [18]. وكذلك يمكن أن يستخدم للكشف عن البكتريا الحلزونية البوابية في عينات مرضية متنوعة مثل الخزع النسيجية، العصير المعوي، اللعاب، والبراز [19]. وايضاً يستعمل هذا الاختبار لتميز الجينوم البكتيري المتنوع، ويستخدم في الدراسات الوبائية [21, 20]. كذلك يكون الاختبار الجزيئي ذا قيمة خاصة للنماذج التي لم يعد بالامكان زراعتها بنجاح بعد النقل المطول أو في حالات تكون عزلة البكتريا غير عملية للزرع بسبب التلوث [22]. وهو ايضا اختبار جيد لتميز طفرات البكتريا الحلزونية البوابية المرتبطة مع المقاومة الناتجة من المضادات الحيوية [24, 23]. وبهذا يساعد الاختبار الجزيئي في خفض نسبة المعالجة الفاشلة [25]. لذا استهدفت الدراسة الحالة الكشف عن الاصابة بالبكتريا الحلزونية Helicobacter pylori باستخدام الاختبار الجزيئي Polymerase chain reaction بأستعمال جينات وعينات مختلفه في مجتمع مدينة الرمادي في محافظة الانبار.

طرائق العمل:

جمع العينات

جمعت العينات من وحدة الناظور في مستشفى الرمادي التعليمي للفترة من 2013/6/1 ولغاية 2014/12/26 ومن كلا الجنسين للفئات العمرية من (70–17) سنة. أذ جمعت 50عينة مرضية و30 عينة سيطرة (البراز، واللعاب، وخزع نسيجية (اربع خزع نسيجيه)). جمعت العينات المرضية من المرضى المصابين بالتهاب أو قرحة المعدة، والتهاب أو قرحة الاثني عشري.

عينات البراز Stool sampling

أخذ من كل مريض عينة براز وضعت في حاوية معقمة. نقلت العينة الى المختبر وحفظت في درجة حرارة 20– درجة مئوية من آجل الاختبار الجزيئي PCR [19].

عينات اللعاب Saliva sampling

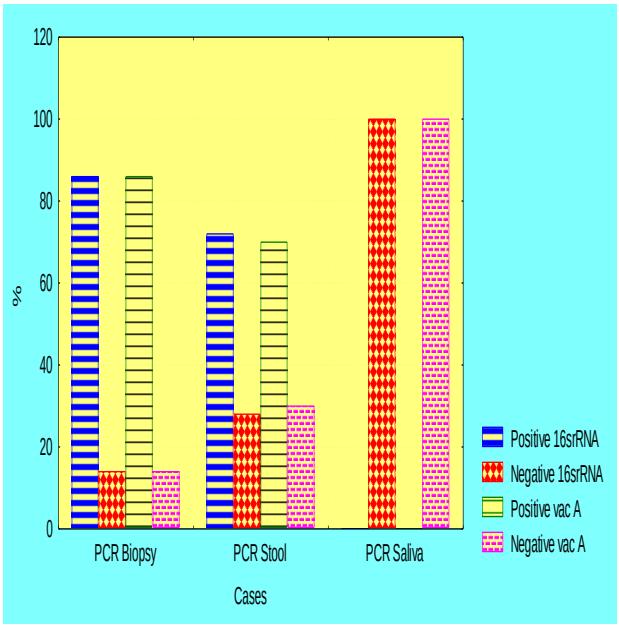
جمع من كل مريض 1 مل من اللعاب ووضع في حاويات نظيفة معقمة، ثم حفظت العينة عند درجة حرارة 20– درجة مئوية لغرض الاختبار الجزيئي [26].

عينات الخزع النسيجية Biopsies sampling

جمع من كل مريض(المصابين بالقرحة الهضمية والتهاب المعدة والاثني عشري) ثلا عينات خزع نسيجية وحسب العلامات السريرية بواسطة الملقط الخاص بجهاز الناظور. وضعت العينات في أنابيب أختبار معقمة محلول الملحي الفسلجي Normal saline بتركيز 0.85، وحفظت في 20- درجة مئوية لحين اجراء الاختبار الجزيئي [27].

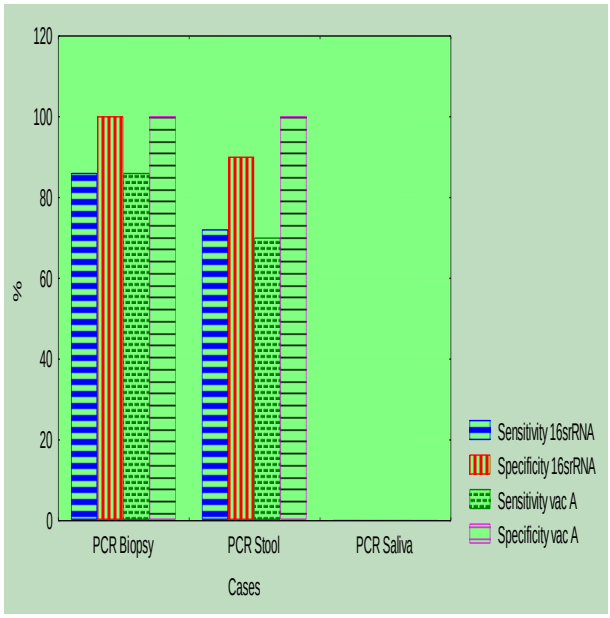
النتائج:

تم الكشف عن الاصابة بالبكتريا الحلزونية البوابيه في دراستنا الحالية باستخدام عينات مختلفة وجينات مختلفة فقد كانت النسبة المئوية الموجبة للاختبار الجزيئي باستعمال عينات الخزع النسيجية 86 % بالنسبة لجين vacA والجين 16srRNA، وعند استخدام عينات البراز فقد كانت النسبة المئوية الموجبة للاختبار الجزيئي هي 70 % بالنسبة للجين vacA و 72% للجين 16srRNA، اما عينات اللعاب فلم تظهر اي نتيجة موجبة وكما موضح في الشكل(١).

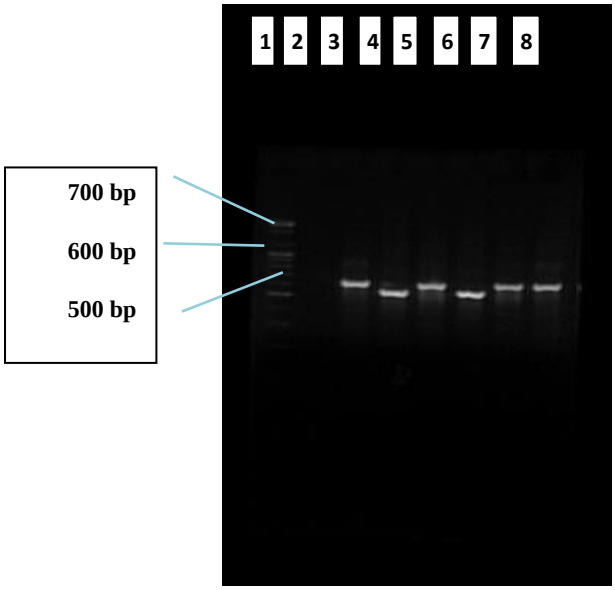


الشكل (١) النسب المئوية لنتائج الاختبار الجزيئي وحسب العينات المستخدمة

وأيضا تم تحديد حساسية وخصوصية الاختبار الجزيئي وحسب العينات المستخدمة فوجد ان حساسية وخصوصية الاختبار الجزيئي هي الاعلى فقد كانت 86% و100% على التوالي بالنسبة لكل الجينات المستخدمة، وقد كانت حساسية وخصوصية الاختبار الجزيئي في حالة استخدام عينات البراز 70% و100% على التوالي عند استخدام الجين vacA و72% و90% على التوالي عند استخدام الجين 16srRNA، اما عينات اللعاب فلم تظهر اي حساسية او خصوصية وكما موضح في الشكل (٢).



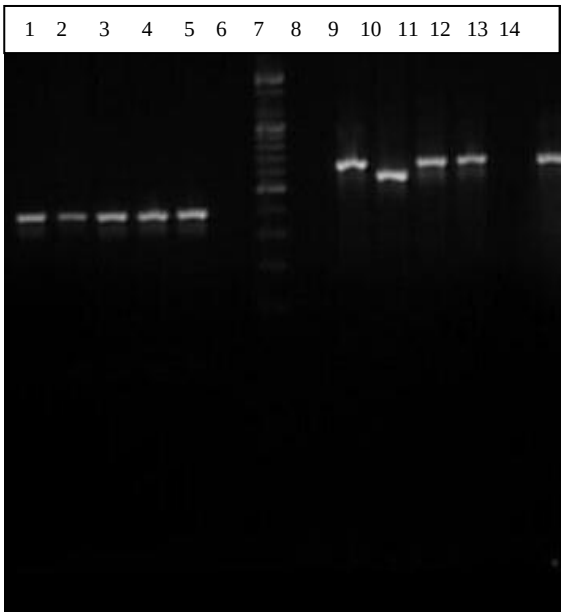
الشكل (٢) حساسية وخصوصية الاختبار الجزيئي وحسب العينات المستخدمة



اللوحة (١) نتائج مكونات الاختبار الجزيئي PCR للبكتريا الحلزونية البوابية المستخلصه من عينات الخزع النسيجية بأستخدام البرايمر vacA وال Ladder (100 – 1000 bp). أذ ان الباندات في المنطقة 567 bp تمثل المنطقه m1 والباندات في المنطقة 642 bp تمثل المنطقة m2. أذ ان الخط الاول يمثل ال Ladder والخط الثاني يمثل النتيجه السالبه للسيطره وبقية (3-6) تمثل النتيجة الموجبة للعينات، وبأستعمال Agarose بتركيز 1.5%.

تمثل المنطقة m2. وتمثل الباندات في المنطقه 399 bp الجين 16SrRNA. ويمثل الخط الوسطي (7) ال Ladder وعلى الجانبين البرايمرات. أذ يمثل الجانب الايمن البرايمر vacA ، والجانب الايسر البرايمر 16SrRNA. يمثل الخط السادس النتيجه السالبه للسيطره بالنسبة للجين 16SrRNA والبقية (5-1) تمثل النتيجة الموجبة للعينات. أما الجانب الايمن فالخط الثامن يمثل النتيجة السالبة للسيطرة، والخط (9-10-11-12-14) تمثل النتيجة الموجبة للعينات، أما الخط 13 يمثل النتيجة السالبه للعينات ، وباستعمال Agarose بتركيز 1.5 %.

اللوحة (٢) نتائج مكونات الاختبار الجزيئي PCR للبكتريا الحلزونية البوابية المستخلصه من عينات الخزع النسيجية بأستخدام البرايمير 16SrRNA وال Ladder (100-1000 bp). أن الباندات في المنطقة 399 bp تمثل الجين 16SrRNA. يمثل الخط الاول ال Ladder والخط الثاني يمثل النتيجه السالبه للسيطره والخط (3-4-5 -6-7-9) تمثل النتيجة الموجبة للعينات، أما الخط 8 يمثل النتيجة السالبه للعينات، وبأستعمال Agarose بتركيز 2 %.



اللوحة (٣) نتائج مكونات الاختبار الجزيئي PCR للبكتريا الحلزونية البوابية المستخلصه من عينات البراز بأستخدام البرايمر vacA والبرايمر 16SrRNA، والLadder (100 - 1000 bp) أذ أن الباندات في المنطقة 567 bp تمثل المنطقه m1 و الباندات في المنطقة 642 bp

المناقشة:

استعمل هذا الاختبار في الكشف عن البكتريا الحلزونية البوابيه باستخدام عينات الخزع النسيجية المعدية واللعاب والبراز. اذ اتفقت نتائج دراستنا الحالية مع دراسة [28] الذي وجد ان 87% من المرضى كانوا موجبين للاختبار الجزيئي PCR باستخدام البرايمرات 16srRNA ، vacA وباستخدام عينات الخزع النسيجية المعدية. ومع دراسة اجراها [29] بأستخدام عينات البراز. اذ تعتبر طريقة الاختبار الجزيئي (PCR) طريقة ذات كفاءة عالية في تشخيص الاصابة بالبكتريا الحلزونية البوابيه فهي لاتعتمد على كثافة البكتريا مثل باقي طرق الكشف التي تحدد كفاءتها كثافة البكتريا. كما ان طريقة الاختبار الجزيئي باستخدام عينات البراز طريقة مفيده للتشخيص قبل وبعد العلاج [30]. اما عينات اللعاب فلم تظهر اي نتيجة موجبة والسبب يعود الى صعوبة نمو البكتريا في مثل اللعاب الذي لايحتوي على مواد تساعد على نمو البكتريا الحلزونية البوابيه [31] كما ان الفلورا الطبيعية الموجودة في الفم لها تأثير مضاد على نمو البكتريا الحلزونية البوابيه عن طريق انتاجها لمادة bacterocin - like (بروتينات مثبطة لنمو البكتريا الحلزونية البوابيه) [32]. فقد أظهرت دراستنا الحالية بأن الحامض النووي DNA للبكتريا الحلزونية البوابيه يمكن ان يشخص عن طريق الاختبار الجزيئي PCR مباشرة من عينات الخزع النسيجية المعدية مع حساسية وخصوصية عالية وكذلك يمكن استعمال عينات البراز في التشخيص فهي ايضاً اعطت حساسية وخصوصية عالية

بأستخدام الاختبار الجزيئي PCR ولكن كانت الحساسية والخصوصية اقل من عينات الخزع النسيجية المعدية والسبب يعود الى ان مكان الاصابة هو المعدة فلهذا تكون البكتريا اكثر تواجداً فية وكذلك ربما يعود السبب لوجود الفلورا الطبيعية في القناة الهضمية التي تقلل من تواجد البكتريا في البراز [32]. ففي دراستنا استخدم اثنين من الجينات الهدف من اجل خفض الشكوك المرتبطة مع استخدام جين مفرد. فقد استخدم العديد من الباحثين الجين 16srRNA في تشخيص الاصابة بالبكتريا الحلزونية البوابيه، فهذا البادیء اثبت قدرته ليكون معلماً حيوياً عالي الحساسية والخصوصية لتشخيص البكتريا الحلزونية البوابيه [33]. وكذلك ذكر [34] بان البكتريا الحلزونية البوابية عزلت من 168مريضاً في جنوب الهند. لكن مع هذا لايمكن الاعتماد على الجين 16srRNA لوحدة في تشخيص الاصابة بالبكتريا الحلزونية البوابيه والسبب يعود الى ان تتابعات الحامض النووي DNA المشفرة لل rRNA موجودة في كل الكائنات الحية مما يزيد من خطر ظهور منتجات غير متخصصة فالتماثل الوراثي له يلعب دوراً هاماً في الحصول على نتائج موجبة خاطئة [35]. لذلك استخدمنا في هذة الدراسة الجين vacA مع الجين 16srRNA، فالجين vacA هو نوع متخصص ومكان مصان جداً في البكتريا الحلزونية البوابيه [35]. فالاختبار الجزيئي اعتماداً على الجين vacA أفضل بشكل عام من الجين 16srRNA وذلك بسبب لخصوصية العالية للاختبار الجزيئي عند استخدام الجين vacA كمعلم لوجود البكتريا الحلزونية البوابية عند استخدام عينات البراز.

يمتلك الجين vacA مناطق متنوعة (s , I , M) وفي دراستنا الحالية تم التشخيص عن طريق تحديد المنطقة m (m1 567 bp , m2 642 bp) فوجد ان السلالات الحامله للنمط الوراثي m2 اكثر انتشاراً من السلالات الحاملة للنمط الوراثي m1 وبنسبة % 62.5 و % 37.5 على التوالي، وهذا متفق مع ما وجده [36] الذي وجد ان النمط الوراثي s1/m2 هو النمط الاكثر انتشاراً.

يكون النمط الوراثي s2/m2 اقل سميه ومرتبطاً مع سوء الهضم غير التقرحي، والنمط s1/m2 مرتبط مع التهاب المعدة والقرحة الهضمية وكذا الحال مع النمط الوراثي s2/m1 اما النمط الوراثي s1/m1 هو النمط الوراثي الاكثر سمية فهو مرتبط مع التهاب المعدة والقرحة الهضمية وسرطان المعدة [32]. وبهذا فان ارتباط الجين vacA بامراضية البكتريا الحلزونية البوابيه يجعله اداة تشخيصية مهمة لتشخيص الاصابة فيمكن اعتبار الاختبار الجزيئي باستخدام الجين vacA المعيار الذهبي للتشخيص باستخدام عينات الخزع النسيجية المعدية وكذلك يمكن اعتباره الطريقة البديلة والمفضلة في الطرق غير الغازية عند استخدام عينات البراز للكشف عن الاصابة وبشكل مبكر.

المصادر:

1. Marshall B.J. ; and Warren , J.R., (1984). unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Journal *Lancet*; Vol. 1: pp. 1311-1315.
2. Hong, LU ; and Shu, Dong XIAO , (2014). New ideas for future studies of *Helicobacter pylori*. Journal of Digestive Diseases, Vol. 15: pp. 1-4.
3. Garza-Gonzalez, Elvira ; Perez-Perez, Guillermo Ignacio ; Maldonado-Garza , Héctor Jesús ; and Bosques-Padilla , Francisco Javier , (2014). A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. journal *World J Gastroenterol* , Vol. 20 , No. 6 : pp. 1438-1449.
4. Atheron , John C.,(1998).H.pylori virulence factors. Journal , British medical Bulletin ; NO.1 : pp 105 - 120.

13. Boyanova, L. ,(2011). *Helicobacter pylori.* Journal Caister Academic press. ISBN 978-1-904455-84-4.

14. Kalaf , Elham Abdulhadi , (2013). Molecular Study for Detection of CagA Genotype of *Helicobacter pylori* from Endoscopic Biopsies of Iraqi Patients. University of Baghdad.

15. Sowjanya , Kanna ; Carla , Maradey-Romero; and Ronnie, Fass ,(2013). Diagnostic tests for *Helicobacter pylori*.Journal Castroenterology Endoscopy News.

16. Ibrahim, Nerman H. ; Gomaa, Azza Abdulazim ; Abu-Sief , Mohamed Ahmed ; Hifnawy , Tamer M. ; and Tohamy, Mervat Abd El-Baser , (2012). The use of different laboratory method in diagnosis of *Helicobacter pylori* infaction ; a comparative study. Jornal Life science , Vol 9, No. 4.

17. Wannmacher, Lennita , (2011). Review of the evidence for *H. pylori* treatment regimens.

18. Chey WD , Wong BC , 2007. American College of Gastroentrology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. Am J Gastroenterol ; 102 (8) : 1808 – 1825

19. Rimbara, E. ; Sasatsu , M. ; and Graham , D.Y., (2013). PCR detection of Helicobacter pylori in clinical samples. Journal Methods Mol Biol, Vol. 943:pp. 279-287. [PMID: 23104297 DOI: 10.1007/978-1-60327-353- 4_19].

20. Whitmire , J.M.; and Merrell, D.S. , (2012). Successful culture techniques for *Helicobacter* species: verification of *Helicobacter* identity using 16SrRNA gene sequence analysis.Journal Methods J Mol Biol, Vol. 921: pp. 37-40. [PMID: 23015489 DOI: 10.1007/978-1-62703-005-2_6].

21. Dus, I. ; Dobosz, T. ; Manzin, A. ; Loi, G. ; Serra , C. ; and Radwan-Oczko, M., (2013). Role of PCR

5. Engstrand , L. ; and Lindberg , M. , (2013). *Helicobacter pylori* and the gastric microbiota. Best Pract. Journal Res. Clin. Gastroenterol., Vol. 27: pp.39-45.

6. Blaser, M.J. (2005): An angered species in the stomach. Journal Sci. Am., Vol. 92: pp. 38-45.

7. Lydia ,Wroblewski E. ; Peek Jr. Richard M.; and Wilson Keith T., (2010). *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk Journal *Clin. Microbiol. Rev.* , Vol.23 , No.4 : pp.713. DOI:10.1128/CMR.00011-10

8. Alessandro , Federico ; Gerarda, Gravina Antonietta ; Miranda, Agnese ; Loguercio, Carmela ; and Romano, Marco , (2014). Eradication of *Helicobacter pylori* infection: Which regimen first?.Journal *World Gastroenterol* ; Vol. 20, No.3: pp 665-672.

9. Zsikla, V. ; Hailemariam, S. ; and Baumann, M., (2006) Increased rate of *Helicobacter pylori* infection detected by PCR in biopsies with chronic gastritis. Journal The Am.J. of Surgical Pathology., Vol. 30 , No. 2 : pp. 242–248.

10. Fukuda , K. ; Kuroki , T. ; Tajima , Y. ; Tsuneoka m N. ; Kitajima , T. ; Matsuzaki , S. ; Furui , J. ; and Kanematsu , T. , (2002). Comparative analysis of *Helicobacter* DNA_s and biliary pathology in patients with and without hepatobiliary cancer. Journal Carcinogenesis , Vol. 23 , pp. 1927 – 1931.

11. Bakir, Wasan A. , (2007). Immunological and Molecular Studies on Gastroduodenal Diseases Caused by Helicobacter pylori. University Anbar.

12. Suerbaum ,S. ; and Michetti , P. , (2002). *Helicobacter pylori* infection. Jornal N Engl J Med, vol. 347: pp. 1175–1186.

Rasmussen, Lucas Trevizani , (2014). Association among *H. pylori* virulence markers dupA, cagA and vacA in Brazilian patients Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases,Vol.20 : pp.1.

28. Ahmed , Khawaja Shakeel ; Madompoyil , Basheer ; Ghebremedhin , Anghesom Ambesajir ; Issac, John ; Ahi ,Janak Dular ; Khan , Aleem Ahmed ; Tiwari, Santosh Kumar , (2013). Studying the Importance of VacA Gene of *Helicobacter pylori* in Identifying the Pathogenicity of Strains by Comparing It with the Disease Status of the Subjects. Journal of Cancer Therapy, Vol. 4 : pp. 68-74.

29. Mishra , S. ; Singh, V.; Rao, G. ; and *et.al*., (2008) Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens: comparative evaluation of nested PCR and antigen detection. Journal Infect Genet E ,vol. 8: pp.815–819.

30. Wesolowska-Andersen , Agata ; Bahl ,Martin Iain ; Carvalh , Vera; Kristiansen , Karsten ; Sicheritz-Ponten , Thomas ; Gupta , Ramneek ; and Licht ,Tine Rask , (2014). Choice of bacterial DNA extraction method from fecal material influences community structure as evaluated by metagenomic analysis. Journal Microbiome , Vol. 2 : pp. 19.

31. Olivier, B. J. ; Bond, R. P. ; van Zyl, W. B. ; Delport, M. ; Slavik, T. ; Ziady, C. ; Terhaar, Sive. Droste, J. S. ; Lastovica, A.; and van der Merwe, S. W., (2006). Absence of *Helicobacter pylori* within the oral cavities of members of a healthy South African community. Journal Clin. Microbiol, Vol. 44: pp. 635–636.

32. Momtaz, Hassan ; Souod, Negar; Dabiri, Hossein; and Sarshar, Meysam , (2012). Study of *Helicobacter pylori* genotype status in saliva , in *Helicobacter pylori* diagnostics and research--new approaches for study of coccoid and spiral : forms of the bacteria. Journal Postepy Hig Med Dosw (Online), Vol. 67: pp.261-268. [PMID: 23619225].

22. Owen, R.J. ,(2002). Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Journal Gut , Vol. 50: pp. 285-289. [PMID: 11839700].

23. Lawson, A.J. ; Elviss, N.C. ; and Owen, R.J. , (2005). Real time PCR detection and frequency of 16srDNA mutations associated with resistance and reduced susceptibility to tetracycline in *Helicobacter pylori* from England and Wales. Journal Antimicrob Chemother , Vol. 56, No. 2 : pp. 282 – 286.

24. de Francesco , V. ; Margiotta, M.; Zullo, A. ; and *et.al*., (2006). Primary clarithromycin resistance in Italy assessed on *Helicobacter pylori* DNA sequences by TaqMan real – time polymerase chain reaction. Journal Aliment Pharmacol Ther , Vol. 23, No. 3 : pp. 429 – 435.

25. Schmitt , B.H. ; Regner, M. ; Mangold, K.A. ; Thomson, R.B.; and Kaul, K.L. , (2013). PCR detection of clarithromycin–susceptible and resistant *Helicobacter pylori* from formalin fixed , paraffin embedded gastric biopsies. Journal Mod Pathol , Vol. 26, No. 9 : pp. 1222 – 1227.

26. Ali , Sama Fakhri , (2013). Detection of *Helicobacter pylori* in saliva from some Iraqi patients in comparison with other methods. M.Sc. , University of Baghdad.

27. Pereira, Weendelly Nayara; Ferraz, Mariane Avante; Zabaglia, Luanna Munhoz; de Labio, Roger William; Orcini, Wilson Aparecido; Ximenez , Joao Paulo Bianchi ; Neto , Agostinho Caleman ; Payao ,Spencer Luiz Marques; and

35. Chisholm , Stephanie A. ; Owen , Robert J. ; Teare , E. Louise ; and ; Saverymuttu , Seth , (2001). PCR-Based Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection and Real-Time Determination of Clarithromycin Resistance Directly from Human Gastric Biopsy Samples. Journal Clinical Microbiology , Vol. 39, No. 4 : p. 1217–1220.

36. Hussein, N.; Robinson, K. ; and Atherton, J. (2008). A study of age specific *Helicobacter pylori* seropositivity rates in Iraq.Journal *Helicobacter*, Vol. 13: pp. 306- 307.

dental plaques, stool and gastric biopsy samples. Journal World J Gastroenterol , Vol. 18 No.17 : pp. 2105-2111. doi:10.3748/wjg.v18. i17.2105.

33. Riggio, M. P. ; Lennon, A.; and Wray, D., (2000). Detection of *Helicobacter pylori* DNA in recurrent aphthous stomatitis tissue by PCR. Journal Oral Pathol. Med., Vol. 29: pp.507– 13.

34. Sushil, Kumar; Ashok, Kumar ;and Vinod, Kumar Dixit , (2010). Diversity in the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* isolates in populations from North and South India. Journal of Medical Microbiology, Vol 59, pp. 32–40.

The detection on the infection with the H.pylori by using molecular test (PCR) by using the different genes and different sampling in the Al-Ramadi city

Dhuha A. Obaid Mohamed Q. Al-Ani Essam M. abd

E.mail: mohammedqais1975@yahoo.com

Abstract

The study aims at finding the infection of *Helicobacter pylori* by using the molecular test (polymerase chain reaction) to finding the genes that most efficient in the diagnosis and the easiest sample in usage. the study collect samples from outpatients who customarily visit the medical sight unit > the collections of the sample include biopsies tissue , stool , and saliva from each patient , as well as , samples were collected from the control group (people who are not infection). After fiat the molecular test for biopsy tissue is most efficient when sensitivity of 86% and specificity of 100% for the different genes usage , and the molecular test for stool samples are the sensitivity and specificity 70 % and 100 % respectively , while the molecular test for saliva sampling are not found the positive result.