

تنمية جرثومة الملوية البوابية *Helicobacter Pylori* المعزولة من خزعات معدية والتحقق منها بالاختبارات البيوكيميائية

أحمد حيدر الشيخ^{1*}، لبنى عبد المجيد مقراني²، غيثاء محمد منصور³

^{1*} طالب دكتوراه، قسم علم الحياة النباتية، جامعة دمشق،

ahmad.alsheikh@damascusuniversity.edu.sy

² أستاذ مساعد في قسم علم الحياة النباتية، جامعة دمشق، بيولوجيا – صحة -تقانة حيوية

l.mokrani@damascusuniversity.edu.sy

³ أستاذ مساعد في قسم علم الحياة النباتية، جامعة دمشق، أحياء دقيقة، صادرات حيوية،

ghaytha.mansour@damascusuniversity.edu.sy

الملخص

جُمعت عينات لخزعات نسيجية أخذت من المعدة لمرضى مشتبه في إصابتهم بجرثومة الملوية البوابية *Helicobacter Pylori* من مشفى الكندي في مدينة دمشق، وقد بلغ عدد العينات 102 عينة (خزعات نسيجية)، تم جمعها خلال الفترة الممتدة من شهر كانون الثاني عام 2023 حتى شهر تشرين الأول من العام نفسه، وتم حفظها ضمن الوسط الناقل الخاص والمغذي للخزعة النسيجية (Brain And Heart Broth) ونقلها إلى المخبر الجرثومي في مشفى الأطفال بمدينة دمشق. تم سحق الخزعات النسيجية بواسطة هاون مع رمل بحري معقم وتنميتها على عدة أوساط زرعيه (Columbia Blood Agar–Blood Agar–EMB–Brain And Heart Agar). كان وسط النقل المستخدم هو الأمثل لنقل الخزعات والاحتفاظ بها ووسط الكولومبيا الآغار هو الوسط الانتقائي الأفضل، وقد أضيف إليه الدم والمتممات الغذائية لنمو أمثل. بلغ عدد العينات الإيجابية 78 عينة والسلبية 24 عينة وتراوحت أعمار المرضى بين 16-74 عاماً، توزعت بين ذكور وإناث. تم إثبات العينات الإيجابية بمجموعة من التفاعلات البيوكيميائية مثل تفاعل الأوكسيداز والكاتلاز واليوريز السريع، واختبار صبغة غرام كما تم إجراء مقاطع نسيجية في قسم التشريح المرضي للمقارنة بين النتائج المخبرية والنسيجية وتم التأكد من إيجابية الجراثيم بواسطة اختبار المعايير بالفلورة بالطريقة المعدلة ضمن بحثنا وعلى جهاز (I CHROMA II). تؤكد هذه النتائج على أهمية إجراء الزرع التحسسي لجرثومة الملوية البوابية لما له من أهمية بحثية وتمكين الباحثين من إجراء الدراسات المختلفة على الجرثومة، بينت النتائج أن اختبارات أنزيم اليوريز والتشريح المرضي كانت ذات حساسية عالية في الكشف عن الجرثومة، وقد كانت الطريقة المتبعة في الزرع ذات نوعية عالية وحساسية منخفضة لما لها من صعوبات وشروط معقدة للحصول على مستعمرات نقية.

تاريخ الإيداع: 2024/03/21

تاريخ القبول: 2024/07/16



حقوق النشر: جامعة دمشق –

سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق

النشر بموجب الترخيص

CC BY-NC-SA 04

الكلمات المفتاحية: الملوية البوابية *Helicobacter Pylori*، خزعات نسيجية، كولومبيا

آغار، المعايير بالفلورة، مستشفى الكندي، مستشفى الأطفال بدمشق، اختبار اليوريز

Cultivation of *Helicobacter Pylori* germ isolated from stomach biopsies and confirmation by biochemical tests

Ahmad Haidar Alsheikh^{1*}, Loubna Abdelmajid Mokrani², Ghaytha Mohamed Mansour³

¹ Ph.D student, Department of Plant Biology, Damascus University, ahmad.alsheikh@damascusuniversity.edu.sy

² Assistant Professor in Department of Plant Biology. Damascus University. Biology-Health-Biotechnology. l.mokrani@damascusuniversity.edu.sy

³ Assistant Professor in Department of Plant Biology. Damascus University. Microbiology. Antibiotics. ghaytha.mansour@damascusuniversity.edu.sy

Abstract

Samples of stomach tissue biopsies taken from the stomach were collected from patients suspected of having helioplasic germ at Al-Kindi Hospital (Damascus). 102 tissue biopsies samples were collected during the period between January and October 2023 of the same year, they were kept within the specific and nutritious transmitting medium (Brain and Heart Broth), then transferred to germ laboratory in Children's Hospital (Damascus). Biopsies were crushed by mortar with sterile sea sand and developed in several mediums (Coloumbia Blood Agar-Blood Agar-EMB-Brain and Heart Agar). The transfer medium was optimal for biopsy transfer and retention, and Central Colombia Aagar (to which blood and nutritional supplements were added) was the best selective medium for optimal growth. Positive and negative samples were 78 and 24 respectively. Patients ages ranged between 16 -74 years, they included males and females. Positive samples were proven by a range of biochemical reactions such as oxidase reaction, catalase, rapid urease and gram dye procedure. Tissue sections were performed in the pathological anatomy department to compare anatomical and biochemical results. Germ's positivity was confirmed by a modified fluorescence calibration test (I CHROMA II). These results underscore the importance of conducting an allergic transplant of *Helicobacter pylori* germ, so that various researches could be carried out. This research also showed that the urease enzyme test and pathological anatomy were highly sensitive for germ detection.

Keywords: *H.Pylori*, Textile Biopsies, Colombia Agar, Fluorescent Calibration, Al-Kindi Hospital, Children Hospital in Damascus, Urease Test.

Received: 21/03/2024

Accepted: 16/07/2024



Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

1. المقدمة Introduction

تعد إصابات الجهاز الهضمي بالجراثيم الممرضة عامة والقرحات المعدية التي تسببها جراثيم الملوية البوابية *Helicobacter Pylori* خاصة الأكثر شيوعاً وتأثيراً في حياة الإنسان على الإطلاق، إذ تتمتع الجراثيم الممرضة بإمكانية التغلب على مناعة الجسم واختراق حواجزه الدفاعية، وإحداث أذيات تظهر بأعراض وعلامات سريرية مختلفة، مسببة الكثير من الأمراض التي قد تكون خطيرة أحياناً على حياة الإنسان (McNulty and Dent 1987, 1638).

يصاب الجهاز الهضمي بالكثير من الحالات المرضية ومنها القرحات، التي تعود لوجود تقرحات تشبه فوهة البراكين في القناة الهضمية المعرضة لأحماض المعدة. كما يمكن أن تسبب الأدوية القرحات كما هو الحال في الأدوية غير الستيرويدية المضادة للالتهاب، ويتسبب في إحداث القرحات مجموعة من العوامل أهمها جراثيم الملوية البوابية *H. Pylori* التي تستوطن منطقة الغار البوابية في المعدة وتتميز بقدرتها العالية على إفراز أنزيم اليورياز الذي يساعدها على مقاومة درجة الحموضة العالية للمعدة (Owen 1998, 17).

عزلت جرثومة الملوية البوابية *H. Pylori* أول مرة عام 1982 من قبل العالمين الاستراليين مارشال Marshall ووارن Warren واعتبرت بداية مهمة لعصر جديد في علم الأحياء المجهرية الطبية للجهاز الهضمي (Warren and Marshall 1983, 1273). تعد الملوية البوابية واحدة من مسببات الأمراض المعدية الأكثر شيوعاً لدى الإنسان، وهي عصيات سلبية الغرام حلزونية الشكل محبة للهواء القليل تستوطن منطقة الغار في معدة الإنسان (Christian et al., 2018, 2).

تصيب حوالي 50% من سكان العالم وأكثر من 80% من سكان البلدان النامية والمكتظة بالسكان، معظم الإصابات غير مرضية، لكنها قد تسبب التهاب معدة مزمن، وقرحات (معدية أو عفجية) وسرطان المعدة (Manhal 2016, 2).

تتصف *H. Pylori* بصغر حجمها وشكل مستعمراتها الشفافة الصغيرة التي تشبه قطرة الماء وتمتاز بظاهرة تعدد الأشكال فقد تظهر بشكل جناح النورس تحت المجهر أو بشكلها العصوي المميز (Han et al., 2000, 3646).

تمتاز بأنها إيجابية لاختبار اليورياز والأوكسيداز والكاتلاز (Abdullah et al., 2023, 34).

لوحظ أن معدل انتشار الملوية البوابية لدى البالغين قد وصل إلى 4% بعد عام 1980 في حين وصل إلى 82% لدى الأفراد الأكبر من ذلك في البلدان الأوربية (Neale and Logan 1995, 77) أما في البلدان النامية فقد تقارب النسبة 100% لدى البالغين (Vyse 2002, 1).

تعتبر جراثيم الملوية البوابية ذات نمو بطيء على أوساط زرع خاصة وتحتاج من (3-5) أيام لنمو مستعمراتها الشفافة ذات رأس الدبوس الصغير وعندما تكون ظروف الزرع غير نموذجية يتحول شكلها من عصوي إلى كروي وهذا ما يعطيها مقاومة وقدرة على البقاء لفترات أطول خارج الجسم خاصة في البراز أو مياه الشرب (Crowe 2013, 6).

2. الأهمية والأهداف

تأتي أهمية هذا البحث من قلة الدراسات التي تهتم بتنمية جرثومة الملوية البوابية في سورية، والحاجة إلى البحث عن الطرق المثالية لتنميتها، ونظراً لإعتماد المختبرات عادة على الاختبارات النسيجية للكشف عنها والتي تعد مكلفة نسبياً؛ لذا كان لابد من دراسة حيوية كيميائية لعدد من الخزعات النسيجية المأخوذة من معدة مرضى مشتبه بإصابتهم بالملوية البوابية، وتسليط الضوء على الطريقة المثالية لتنميتها ودراستها وإمكانية الاستفادة منها في المجالات الطبية والصيدلانية بسبب انتشارها الواسع والمرافق غالباً لمعظم حالات القرحات المعدية. يهدف البحث إلى:

1- جمع خزعات مأخوذة من مرضى مشتبه بإصابتهم بالقرحة المعدية وتحديد الوسط الناقل المناسب لحفظ الخزعات.

2- أمثلة طريقة تنمية جرثومة (*H. Pylori*).

3- تحديد هوية الجرثومة بطرق بيوكيميائية حيوية متعددة بالإضافة للطريقة النسيجية.

3. الدراسة المرجعية Literature Review

بينت العديد من الدراسات أن هناك أنواعاً عديدة من *H. Pylori* تصيب الإنسان والحيوان وأن لديها القدرة على استعمار مناطق معوية عدة والتسبب في التهاب المعدة، منها *H. mustelae* *H. heimanni* إلا أن *H. Pylori* أكثر شيوعاً وإحداثاً للأمراض البشرية، أما الأنواع الأخرى فلم يتم العثور عليها عند الإنسان (Blaser et al., 2004, 321).

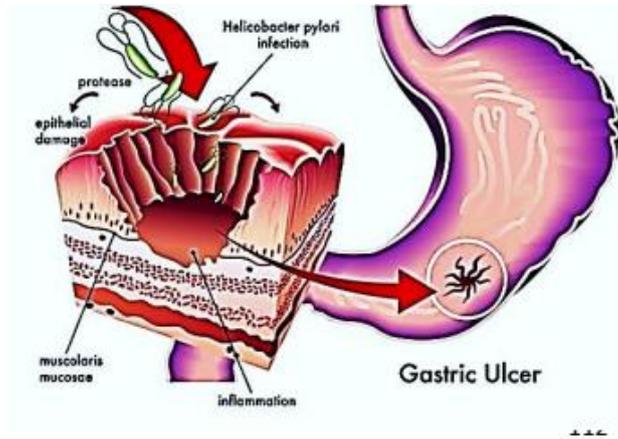
تعد الدراسات التي تهتم بتنمية الملوية البوابية قليلة في بلادنا مقارنة بالجراثيم الأخرى بالرغم من الإصابات الكثيرة بالقرحة المعدية إذ ترتبط الإصابة بالظروف المعيشية حيث يمكن أن تحدث قبل سن 10 سنوات وتزداد نسبتها مع تقدم العمر وفي حال تواجدها بمخاطبة المعدة فإن هذا يعني أنها ستبقى مدى الحياة إذا لم يتم علاجها (Archer et al., 1988, 101).

تختص جرثومة الملوية البوابية بكونها النوع الوحيد من الجراثيم الذي يمكنه أن يخترق الأنسجة المبطنه للمعدة لتستطيع النمو والتكاثر في الغشاء المخاطي (شكل 1)، على الرغم من حموضة العصارة الداخلية للمعدة حوالي 80% من التقرحات مرتبطة ارتباطاً وثيقاً بالملوية البوابية و20% من هذه الحالات تعزى لتناول مُضادات الالتهاب غير الستيرويدية.

ومن أهم العوامل المسببة للقرحة المعدية بواسطة *H. Pylori*: أحداث تغيرات في الغشاء المخاطي للمعدة وإفراز الأمونيا بواسطة أنزيم اليورياز والالتصاق بالخلايا الظهارية للتخفي من الاستجابة المناعية (Ernst et al., 1996; Boyanova 2011, 1018).

كما أظهرت الدراسات أن عينات اللعاب لم تكن مفيدة في الكشف عن جراثيم الملوية البوابية ولم تظهر أي نتائج موجبة بسبب صعوبة نمو البكتيريا في اللعاب (Olivier et al., 2006, 635).

كما أن الفلورا الطبيعية الموجودة بالفم لها تأثير مضاد لنمو جراثيم الملوية البوابية عن طريق إنتاجها مادة (Like-bacterocin) وهي عبارة عن (بروتينات مثبطة لنمو البكتيريا) (Hassan et al., 2012, 17).



الشكل 1. إصابة الطبقة المخاطية للمعدة بجرثومة الملوية البوابية *H. Pylori*

اعتبرت العديد من الدراسات الحديثة أن جرثومة الملوية البوابية المسبب في بعض الحالات لسرطانات المعدة والعفج والإثني عشرية والأنسجة اللمفاوية ولكنها قد تكون متعايشة أحياناً ولا تظهر أية أذيات أو أعراض (Sitkin et al., 2022, 766).

كما أظهرت دراسة أن من بين كل عشرة إصابات بالملوية البوابية هناك إصابة واحدة فقط مرتبطة بسرطان المعدة (Erzooki and Manhal 2016, 1).

4. مواد البحث وطرائقه Materials and Methods

أجري هذا البحث في المختبر الجرثومي في مشفى الأطفال في مدينة دمشق بالتعاون مع شعبة التنظير الهضمي في قسم الداخلية بمشفى الكندي في دمشق، وذلك خلال الفترة الممتدة ما بين كانون الثاني عام 2023 حتى تشرين الأول من العام نفسه.

1.4. الأجهزة ومواد البحث:

تم استخدام أوساط مختلفة خلال البحث:

1- وسط (BHI Broth (Brain Heart Infusion): سبب الاستخدام لنقل العينة (الخزعة) إلى المختبر الجرثومي وإجراء التنمية والاختبارات البيوكيميائية.

2- وسط Columbia Blood Agar: سبب الاستخدام لتنمية عزلات جراثيم الملوية البوابية

3- وسط (BHI Agar (Brain Heart Infusion): سبب الاستخدام لتنمية عزلات جراثيم الملوية البوابية

• ثلاجة بدرجة حرارة (+4 ، -20 درجة مئوية)

• مجهر ضوئي.

• (حجرة الزرع الجرثومي) (Flow Air Laminar) مزودة بلمبة UV .

• (جهاز الصاد الموصد) (Autoclave) لتعقيم الأوساط الزرع عند درجة الحرارة /121/ درجة مئوية.

• فرن حرارة جاف لتعقيم الأدوات الزجاجية .

• ميزان حساس (0.0000 mg)

• أطباق بلاستيكية معقمة للتنمية.

• ماسحات قطنية.

• لاقحات بلاستيكية معقمة.

• كحول.

• أنابيب زجاجية محكمة الإغلاق ومجهزة بأغطية

2.4. طرائق التشخيص المخبري لجراثيم الملوية البوابية

تعتمد هذه الطرق على أخذ خزعة نسيجية من المريض بواسطة جهاز التنظير، وذلك بعد التأكد على المريض بعدم تناول الأدوية الحاوية على المضادات أو مثبطات مضخات البروتون قبل عدة أيام من أخذ الخزعة.

1.2.4. طريقة إجراء عملية التنظير:

تتم هذه العملية بواسطة جهاز التنظير، حيث يعتبر هذا الجهاز الأداة التشخيصية التي تفيد في تحديد وجود القرحة ومكان توضعها، ويجب أن يكون جهاز التنظير نظيف تماماً لمنع انتقال جراثيم الملوية البوابية من شخص لآخر وتم استخدام خازع خاص لبحثنا هذا ويتم تعقيمه بشكل دوري حيث أثبتت بعض الدراسات السابقة عن إمكانية انتقال جراثيم الملوية البوابية بواسطة أجهزة التنظير غير المعقمة. (Martin 1994, 1799)

2.2.4. طريقة الزرع الجرثومي (Culture Method)

بعد إجراء عملية التنظير الهضمي العلوي لعدد من المرضى المشتبه بإصابتهم بالملوية البوابية من قبل الطبيب المختص، تم وضع الخزعة النسيجية في أنبوب معقم حاوٍ على 2-3/ مل من الوسط الزرع المغذي المخصص لنقل الخزعة النسيجية إلى المختبر (Brain-Heart Infusion Broth) ونقلت إلى المختبر لفحصها بطريقة الزرع الجرثومي.

تمت زراعة العينات على وسطين انتقائيين لتنمية جراثيم الملوية البوابية وهما: (Columbia blood Agar- Brain-Heart Agar) أضيف إلى هذه الأوساط مجموعة من المواد للحصول على أفضل نمو لجراثيم الملوية البوابية وبيّن الجدول أدناه سبب إضافة كل مادة للوسطين الانتقائيين ونسبة كل إضافة، مع العلم أن جرثومة الملوية البوابية مقاومة لجميع الصادات الحيوية المضافة إلى الأوساط وتم تعقيم هذه الصادات بواسطة عملية الفلترية ومن ثم إضافتها للأوساط الزرع بعد تعقيّمها وتبريدها حتى 45 درجة مئوية (Skirrow 1977, 9).

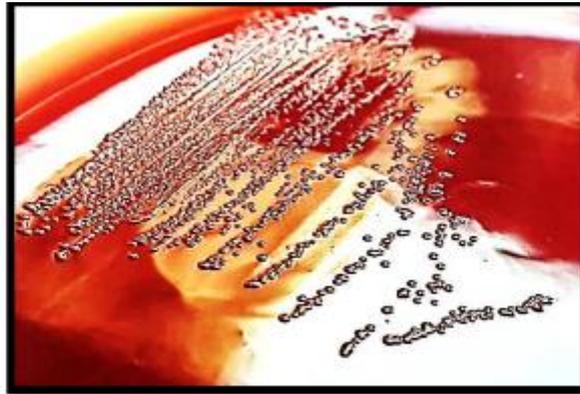
تم الاحتفاظ بالأوساط الزرعية الصلبة بعد تحضيرها لمدة أقصاها أسبوع فقط في درجة حرارة +4 مئوية واستخدامها ضمن الأسبوع التي حضرت فيه لأن النمو الأمثل لجرثومة الملوية البوابية يحتاج لأوساط محضرة حديثاً وبشكل مستمر، وتحتاج إلى جو رطب جداً

الجدول 1. المواد المضافة إلى وسطي التنمية (Columbia blood Agar- Brain-Heart Agar)

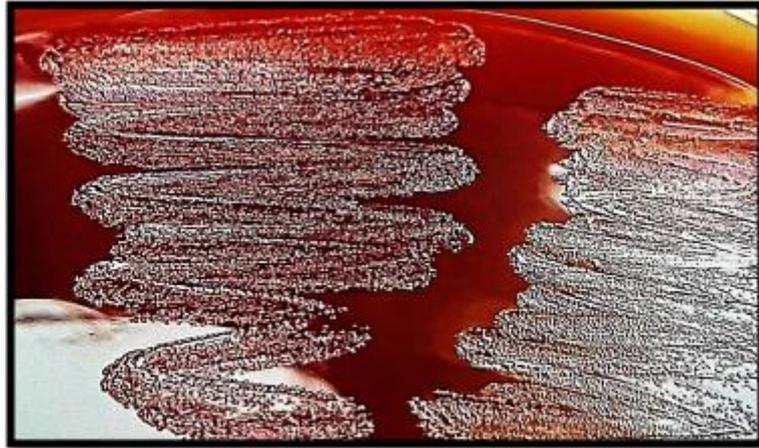
تركيزها بالوسط الزرع	سبب الإضافة	اسم المادة المضافة
10 mg/ L	صاد حيوي لمنع نمو الجراثيم إيجابية الغرام	Vancomycin
5 mg/ L	صاد حيوي لمنع نمو الجراثيم إيجابية الغرام	Trimethoprim
5 mg/ L	لمنع نمو الفطور	Nystatin
0.3 mg/ L	صاد حيوي لمنع نمو الجراثيم إيجابية الغرام	Polymyxin B
7% من الوسط الزرع	يساعد على نمو جراثيم الملوية البوابية	دم الأغنام الطازج

طريقة الزرع: بعد نقل الخزعة النسيجية إلى المختبر تم إخراجها من الوسط الناقل السائل (BHI) ثم وضعها ضمن هاون معقم وأضيف إليها 1/مل من وسط النقل ويضع حبات من الرمل البحري المعقم وتمت مجانستها في الهاون المعقم ثم تم نقل حوالي 300-500/ميكرو ليتر من المزيج المتجانس وفرشت بشكل متجانس على كامل سطح الوسطين الزرعين الانتقائيين بواسطة لاقحة بلاستيكية معقمة ولمرة واحدة تستخدم فقط. (Ndip *et al.*, 2003, 22)

تم حضن الأطباق ضمن حاضنة CO₂ ويتوفر الرطوبة 96% وكمية أوكسجين قليلة لمدة بين (5-7) أيام.



الشكل 2. مستعمرات الملوية البوابية النقية على وسط الزرع الانتقائي Columbia Blood Agar



180

الشكل 3. مستعمرات الملوية البوابية النقية على وسط الزرع الانتقائي Brian Heart Agar

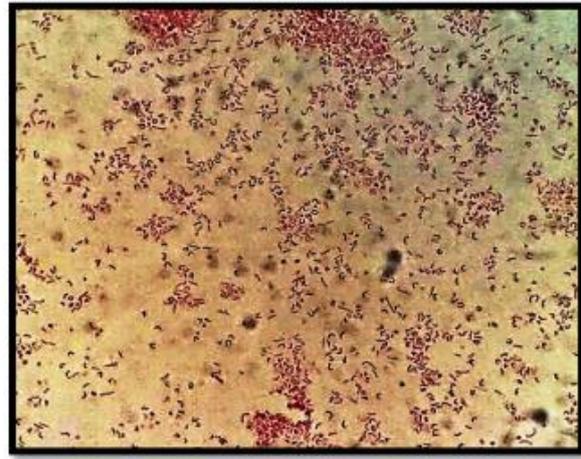
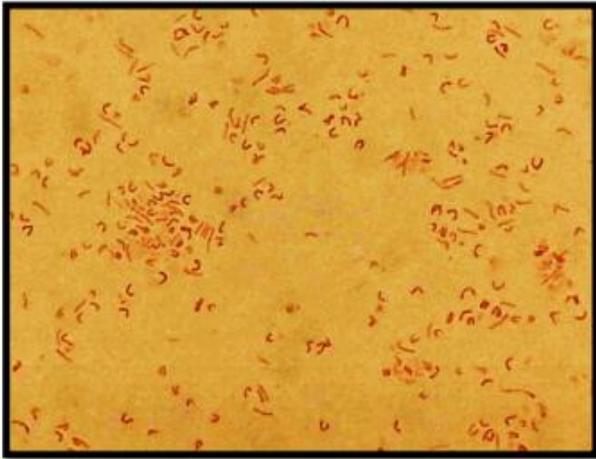
5. التعرف على عزلات جراثيم الملوية البوابية

تم التعرف على جراثيم الملوية البوابية بإتباع مجموعة من الطرق:

إجراء صبغة غرام المعدلة لعزلات جرثومة الملوية البوابية:

تم إجراء صبغة غرام لعزلات جرثومة الملوية البوابية مع استبدال صبغة السيفرانين في المرحلة الأخيرة من عملية الصبغ بمادة الـ (Fuchsin) (Martin 1994, 1799).

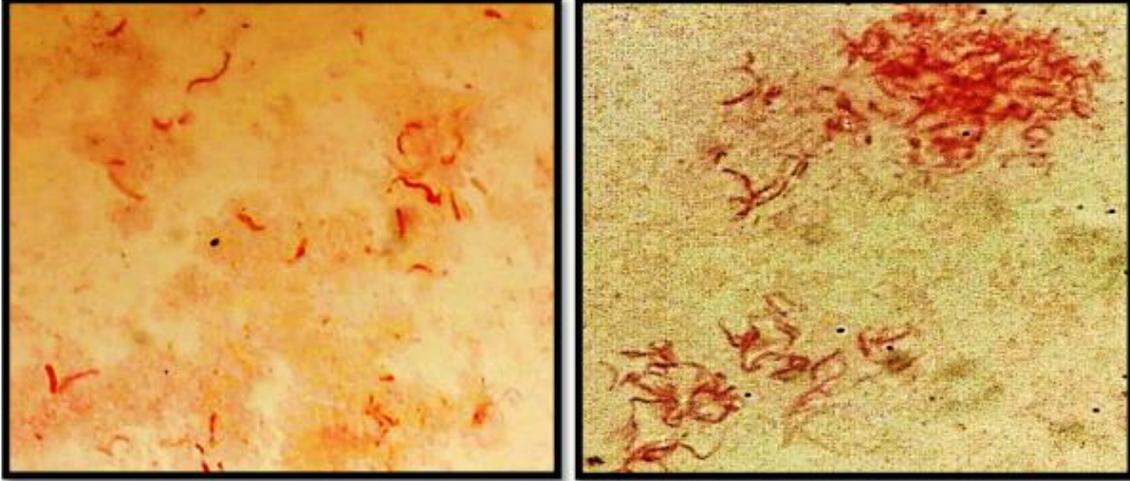
بعد الصبغ تم التعرف على جرثومة الملوية سلبية الغرام وبدت أحياناً بشكلها المميز والفريد (S) كما بدت في كثير من الأحيان بشكل عصوي منحني كما في الشكلين (4) (5).



189

الشكل 4. مقاطع محضرات مجهرية مصبوغة بصبغة غرام لمستعمرات جرثومة الملوية البوابية *H. Pylori* وظهور الشكل

المميز والفريد لها (S).



الشكل 5. مقاطع محضرات مجهرية مصبوغة بصبغة غرام لمستعمرات جرثومة الملوية البوابية *H. Pylori*

6. الاختبارات الكيميائية الحيوية:

1.6 اختبار الكاتالاز: تم أخذ مستعمرة جرثومية نامية من الوسط الصلب بواسطة اللاقحة ووضعت في قطرة من الماء الأوكسجيني الموضوع على شريحة زجاجية حيث تمت ملاحظة صعود فقاعات الأوكسجين O₂ الذي يدل على إيجابية التفاعل لجرثومة الملوية البوابية (Martin 1994, 1799).



197

198

الشكل 6. اختبار الكاتالاز للكشف عن إيجابية جرثومة الملوية البوابية *H. Pylori*

2.6 اختبار الأوكسيداز: أجري هذا الاختبار بنقل مستعمرة من جراثيم الملوية البوابية إلى صفيحة خاصة بالاختبار من إنتاج شركة (BD BBL) مشربة بكاشف الأوكسيداز وتمت مراقبة تغير اللون إلى الأزرق الغامق (البنفسجي) بعد بضعة ثوانٍ كما تم التجريب أيضاً على أقراص مشربة بالكاشف وتغير اللون إلى الأزرق الغامق وهذا ما يدل على إيجابية التفاعل مع العلم أن جرثومة الملوية البوابية إيجابية لتفاعل الأوكسيداز (Martin 1994, 1799).



الشكل 7. اختبار الأوكسيداز للكشف عن إيجابية جرثومة الملوية البوابية *H. Pylori*

3.6. اختبار اليورياز: يعتبر هذا التفاعل من أهم التفاعلات الكيميائية الحيوية المميزة لجراثيم الملوية البوابية والذي يعتمد على تلقح أنبوب حاوٍ على الوسط المعقم (Urea Broth) من شركة HIMEDIA بجراثيم الملوية البوابية وحضن هذه الأنابيب بدرجة حرارة 37 درجة مئوية ضمن حاضنة CO2 وعند تحول اللون من الأصفر إلى الزهري كان ذلك دليلاً على إيجابية هذا التفاعل وتعتبر جراثيم الملوية البوابية إيجابية لهذا التفاعل.



الشكل 8. اختبار أنزيم اليورياز للكشف عن إيجابية جرثومة الملوية البوابية *H. Pylori*

7. طريقة التشريح المرضي: يتم وضع الخزعة النسيجية ضمن قالب بلاستيكي خاص ضمن جهاز الإدماج لمدة 18 ساعة ويتم تقطيعه إلى شرائح نسيجية متعددة. تأخذ واحدة منها وتوضع على شريحة زجاجية وتصبغ بصبغة جيمزا وتظهر جراثيم الملوية البوابية بلون أزرق غامق في لمعة الغدد المعدية.



الشكل 9. مقطع نسيجي في لمعة غدد معدية مصبوغ بصبغة (Gimsa) وظهور جراثيم الملوية البوابية بلون أزرق غامق.
8.المعايرة الحيوية بطريقة الفلورة (FIA) للكشف النوعي عن جرثومة الملوية البوابية *H. Pylori*

تستخدم طريقة الكشف الحيوي (مبدأ الشظيرة) وهي عبارة عن ما يلي:

- يحتوي الوقاء (Buffer) على أضداد موسومة بمادة قابلة للفلورة لجرثومة الملوية البوابية *H. Pylori*
 - في حال وجود الجرثوم يتشكل معقد (ضد-مستضد) مع الأضداد القابلة للفلورة
 - يضاف المعقد لصفحة مغلله مسبقاً بـ (Second Antibodies) اتجاه المعقد
 - في حال تثبيت المعقد نتيجة وجود الجرثوم يتم الكشف عنه بطريقة الفلورة وتكون شدة الفلورة الناتجة متناسبة كماً مع كمية الجراثيم الموجودة بالعينة (Vijayad and Chandrashekar 2012, 9)
 - لكننا قمنا بتعديل عمل الطريقة المتبعة أعلاه بما يتناسب مع تنمية الجراثيم والحصول على مستعمرات نقية واستبدال العينة البرازية بالمستعمرة الجرثومية وفق ما يلي:
- 1- تم عزل مستعمرة واحدة لكل عينة من المستعمرات الوصفية لجرثومة الملوية البوابية بعد اجراء كافة الاختبارات الكيميائية الحيوية (أوكسيداز-كاتالاز-يورياز-صبغة غرام...) وكانت جميعها إيجابية، ثم قمنا بتطبيق الاختبار المناعي المعدل ببحثنا.
 - 2- نقوم بتمديد المستعمرة على 0.5 MFU ثم نخفف إلى 10 ميكرون/5 مل وذلك لإعطاء كمية بكتريا قليلة توافق كمية البكتريا التي ممكن أن تكون ببراز المريض.
 - 3- نقوم بأخذ قطرتين من المحلول الممدد وتتم إضافتها للوقاء (Buffer) المرافق للكاشف.
 - 4- ثم نتابع بوضع العينات ضمن جهاز (I CHROMA II) لقراءة النتائج حيث يعطي النتيجة إيجابية أو سلبية



248

249

الشكل 10. الكيت المستخدم لطريقة المعايرة بالفلورة مع الجهاز الخاص لقراءة النتائج (I CHROMA II)

9. النتائج والمناقشة Results and Discussion

شملت الدراسة 102 مريضاً من المرضى المراجعين لقسم التنظير الهضمي في مشفى الكندي، 76 منهم يعانون من القرحة الهضمية و 26 مريض يعانون من شكايات هضمية أخرى غير القرحة الهضمية تم استخدامهم في الدراسة للمقارنة بين نسبة وجود جراثيم الملوية البوابية عند هؤلاء المرضى إلى نسبة وجودها عند مرضى القرحة الهضمية. تم التحري عن الإصابة بجراثيم الملوية البوابية عند جميع المرضى باستخدام طرق تشخيصية مختلفة، وذلك خلال الفترة الممتدة ما بين كانون الثاني عام 2023 حتى تشرين الأول من العام نفسه.

1.1. نتائج المقارنة بين الطرق التشخيصية المختلفة:

نظراً لدقة طريقة اختبار أنزيم اليورياز المعتمدة للكشف عن جراثيم الملوية البوابية ضمن مستخلص الخزعة، فقد تم اعتبارها كطريقة قياسية مرجعية للتعرف على حساسية ونوعية الطرق الأخرى من الزرع الجرثومي، التشريح المرضي، طريقة المعايرة الحيوية بالفلورة، وذلك من خلال مقارنة نتائج طريقة اختبار أنزيم اليورياز مع نتائج الطرق الأخرى. يوضح الجدول (2) أعداد المرضى (المصابين بالقرحة الهضمية والذين يعانون من شكايات هضمية أخرى) والذين أعطوا نتائج إيجابية في جميع الطرق السابقة.

الجدول 2. أعداد المرضى (المصابين بالقرحة الهضمية والذين يعانون من شكايات هضمية أخرى) ونتائج العينات الإيجابية لجرثومة الملوية البوابية.

المرضى المصابين بالشكايات الهضمية الأخرى (26 مريض)		المرضى المصابين بالقرحة الهضمية (76 مريض)		الطريقة المتبعة
30.76%	8	92.10%	70	اختبار أنزيم اليورياز
7.69%	2	47.36%	36	الزرع الجرثومي
15.38%	4	80.26%	61	التشريح المرضي
0%	0	47.36%	36	طريقة المعايرة الحيوية بالفلورة

2.2. نتائج طريقة الزرع الجرثومي والمقارنة مع طريقة اختبار اليورياز:

نلاحظ من الجدول (2) أن الزرع الجرثومي أظهر 36 مريضاً مصاباً بالملوية البوابية وذلك من أصل 76 مريض مصاب بالقرحة الهضمية أي بنسبة % 47.36 من مجموع المرضى المصابين بالقرحة الهضمية. أما بالنسبة لعدد الأشخاص غير المصابين بالقرحة الهضمية فقد تم الحصول بطريقة الزرع الجرثومي على 2 مريض مصاب بجراثيم الملوية البوابية من أصل 26 مريض

أي بنسبة 7.69% من مجموع المرضى غير المصابين بالقرحات الهضمية. وعند إجراء مقارنة بين نتيجة طريقة اختبار اليورياز وطريقة الزرع الجرثومي للمرضى المصابين بالقرحة الهضمية المترافقة مع جراثيم الملوية البوابية، نجد أن طريقة الزرع الجرثومي أعطت أقل نتيجة إيجابية، 36 مريضاً مقارنة مع جميع الإختبارات الأخرى، وكذلك مقارنة مع طريقة اختبار اليورياز والتي كان عدد المرضى الإيجابيين بنتيجتها 70 مريض.

الجدول 3. مقارنة إحصائية بين طريقة الزرع الجرثومي وطريقة اختبار اليورياز

طريقة اختبار اليورياز	طريقة الزرع الجرثومي	
70	36	أعداد المرضى الإيجابيين
6	40	أعداد المرضى السلبيين
76	76	المجموع

نجد مما سبق بأن طريقة الزرع الجرثومي تمتلك حساسية منخفضة (47.36%) وهذا ما يدل على وجود نسبة سلبية كاذبة عالية تقدر بـ (53%) (كيالي، 2007).

إن عزل جراثيم الملوية البوابية من الخزعات يثبت لنا وجودها بينما حصلنا على نتيجة سلبية للزرع أي عدم حصول أي نمو للمستعمرات الجرثومية فإنه لا يدل حتماً على عدم وجود الجرثومة ضمن الخزعة النسيجية لأن هذه الجراثيم من أصعب الأنواع عزلاً وتنمية بالإضافة الى احتمال أخذ الخزعة من المعدة من مكان لا تتواجد ضمنه هذه الجراثيم وهذا يزيد تعقيد الحصول عليها من خلال التتمية ويعتمد الأمر إلى حد كبير على خبرة الطبيب المختص في إيجاد المظهر للنسيج المعدي الذي يتوقع أن توجد ضمنه الجراثيم والذي يأخذ مظهر حجارة الرصيف غالباً أو الشكل الحمامي المتوادم.

إن معظم الأبحاث لا تعتمد على طريقة الزرع للتحري والتأكد من إصابة المريض بجراثيم الملوية البوابية إنما تعتبر، فقط طريقة مرجعية خاصة للتحري عن حساسيتها اتجاه الصادات الحيوية المستخدمة لعلاجها والكشف عن أي مقاومة قد تبديها اتجاه هذه الصادات (Logan Logan and Walker 2001, 2; Zaghoul 2012, 2161).

3.9. نتائج طريقة المعايرة بالفلورة والمقارنة مع طريقة اختبار اليورياز:

نلاحظ من الجدول 2 أنه بنتيجة المعايرة بالفلورة تم الحصول على 36 مريضاً مصاباً بالملوية البوابية وذلك من أصل 76 مريضاً مصاباً بالقرحات الهضمية أي بنسبة 47.36% من مجموع المرضى المصابين بالقرحات الهضمية. أما بالنسبة لعدد الأشخاص غير المصابين بالقرحات الهضمية فلم نحصل على أي نتيجة لأن نجاح الاختبار وفق الطريقة المعدلة يعتمد على الحصول على تأكيد للنتيجة من المستعمرات الجرثومية النقية أي أن نجاح الطريقة مرتبط بنجاح طريقة الزرع الجرثومي، أي كانت النسبة 0% من مجموع المرضى غير المصابين بالقرحات الهضمية. وعند إجراء مقارنة بين نتيجة طريقة اختبار اليورياز وطريقة المعايرة بالفلورة للمرضى المصابين بالقرحة الهضمية المترافقة مع جراثيم الملوية البوابية، نجد أن طريقة المعايرة بالفلورة أعطت أقل نتيجة إيجابية، 36 مريضاً مقارنة مع جميع الإختبارات الأخرى (جدول 4) وكذلك مقارنة مع طريقة اختبار اليورياز والتي كان عدد المرضى الإيجابيين بنتيجتها 70 مريضاً ويعود ذلك كما أشرنا سابقاً أن نجاح هذه الطريقة مرتبط بنجاح طريقة الزرع الجرثومي لأن هذه الطريقة هي لتأكيد نتيجة الزرع الجرثومي.

الجدول 4. مقارنة إحصائية بين طريقة المعايرة بالفلورة وطريقة اختبار اليورياز

طريقة اختبار اليورياز	طريقة المعايرة بالفلورة	
70	36	أعداد المرضى الإيجابيين
6	40	أعداد المرضى السلبيين
76	76	المجموع

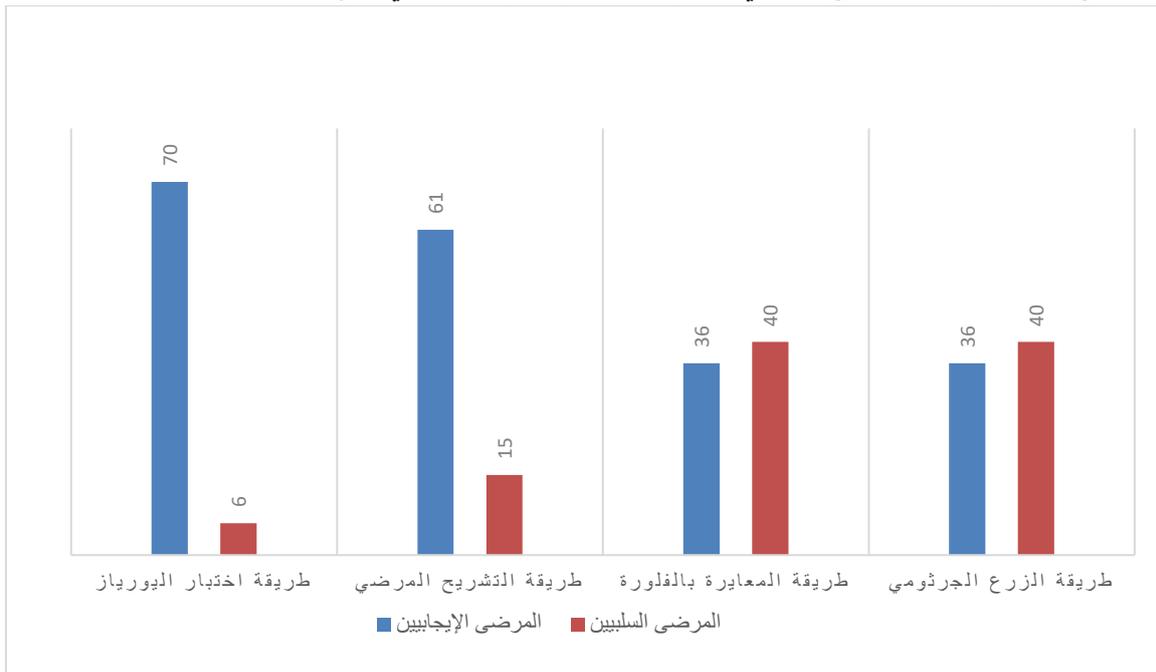
4.9. نتائج طريقة التشريح المرضي والمقارنة مع طريقة اختبار اليورياز:

نلاحظ من الجدول (2) بأن عدد المرضى المصابين بالقرحات الهضمية والذين أعطوا نتيجة إيجابية في التحري عن جراثيم الملوية البوابية بطريقة التشريح المرضي 61 مريض وذلك من أصل 76 مريضاً أي بنسبة (80.26%) من مجموع المرضى المصابين بالقرحات الهضمية. أما عدد المرضى غير المصابين بالقرحات الهضمية والذين أعطوا نتيجة إيجابية أثناء الفحص بطريقة التشريح المرضي فقد كان 4 مرضى من أصل 26 مريضاً وذلك بنسبة 15.38%، وبإجراء مقارنة بين نتيجة طريقة اختبار اليورياز ونتيجة طريقة التشريح المرضي بالنسبة لعدد المرضى المصابين بالقرحات الهضمية المترافقة مع جراثيم الملوية البوابية نجد أن عدد المرضى الإيجابيين باستخدام هذه الطريقة أقل بشكل بسيط مما هو عليه بطريقة اختبار اليورياز، وقد يعود ذلك إلى وجود أخطاء وصعوبات أثناء العمل وتحضير (صبغة جيمزا) أو بسبب استعمال المريض للصادات الحيوية أو مثبطات مضخة البروتون قبل إجراء عملية التنظير وهذا ما قد يعطي نتائج سلبية كاذبة وينتج عنها اختلاف النسب بين نتائج التشريح المرضي وطريقة اختبار اليورياز.

الجدول 5. مقارنة إحصائية بين طريقة التشريح المرضي وطريقة اختبار اليورياز

طريقة التشريح المرضي	طريقة اختبار اليورياز	
61	70	أعداد المرضى الإيجابيين
15	6	أعداد المرضى السلبيين
76	76	المجموع

يمكن أن نستنتج بأن طريقة اختبار التشريح المرضي للتحري عن جراثيم الملوية البوابية هي تتمتع بنوعية عالية – (High Specificity)



الشكل 11. يوضح العلاقة بين عدد المرضى الإيجابيين بجرثومة الملوية البوابية والسلبيين لها وفق مجموعة من طرق الكشف الكيميائية المتعددة.

بينت نتائج الدراسة الحالية بالنسبة للتحري عن جراثيم الملوية البوابية لدى مرضى القرحات الهضمية باستخدام طرق تشخيصية مختلفة، بأن طريقي التشريح المرضي وطريقة اختبار أنزيم اليورياز للزرع النسيجية هي طرق ذات حساسية عالية (High Sensitivity) حيث بلغت نسبة الحساسية لطريقة التشريح المرضي (80.26%) ونسبة طريقة اختبار أنزيم اليورياز (92.10%)، كما هو موضح في الجدول رقم (2).

لم تتفق نتائج دراستنا في التشريح المرضي مع دراسة (Farah *et al.*, 2015, 2) التي وجدت أن 12% فقط من المرضى المصابين بالقرحات المعدية ظهرت نتيجتهم إيجابية في الفحص النسيجي بينما كانت بدراستنا 80.26% وهذا يدل على أن النوعية بأخذ الخزعة النسيجية من المكان المتوادم أو المتقرح أو الذي يظهر عليه التهاب حمامي هو الذي يعطي النتيجة الصحيحة

اتفقت نتائج دراستنا في الزرع الجرثومي مع دراسة (Reddy *et al.*, 2015, 581) الذي وجد ان 20% من المرضى ظهرت لديهم نتيجة موجبة لاختبار الزرع الجرثومي بالرغم من الخصوصية العالية لهذا الاختبار والسبب يعود الى صعوبة متطلبات جرثومة الملوية البوابية (Siavoshi *et al.*, 2014, 63).

اتفقت نتائج دراستنا في اختبار أنزيم اليورياز مع دراسة (Reddy *et al.*, 2015, 581) الذي وجد ان 58% من المرضى كانوا موجبين لاختبار أنزيم اليورياز

فهذه النسبة العالية من الحساسية لدى المصابين بهذا الجرثوم التي أبدتها هذه الطرق تمثل تواتر النتائج الإيجابية نسبة إلى جميع النتائج لدى المصابين بالجرثوم والتي تشمل النتائج الإيجابية الناتجة عن هذه الجرثومة حيث تشير هذه النسب العالية للطريقتين السابقتين إلى كون المريض الذي لديه نتيجة سلبية بأنه غير مصاب بالفعل بهذه الجرثومة (كيالي، 2007).

كما تبين من خلال الدراسة بأن طريقتي الزرع الجرثومي والتشريح المرضي تعتبر من الطرق التشخيصية التي تتمتع بنوعية العالية (High Specificity) حيث تشير هذه النسب إلى أن الشخص الذي لديه نتيجة إيجابية قد يكون بالفعل مصاباً بجرثومة الملوية البوابية.

أما نسبة الحساسية لطريقة الزرع الجرثومي فقد كانت نسبة منخفضة (47.36%) مما يدل على وجود نسبة سلبية كاذبة مرتفعة تصل إلى (53%).

الجدول 6. إيجابيات وسلبيات طرق التحري المختلفة عن جرثومة الملوية البوابية في الخزعات

طريقة التشخيص	إيجابيات الطريقة	سلبيات الطريقة
طريقة الزرع الجرثومي	تفيد في البحث العلمي والتحري عن مقاومة الصادات الحيوية ومتابعة طرق التطوير العلاجي لها.	مكلفة جداً- تحتاج إلى فترة زمنية طويلة لنمو المستعمرات- الظروف والشروط المعقدة لنموها- حساسيتها منخفضة
طريقة إختبار اليورياز	لا تحتاج لوقت طويل وسريعة بإعطاء النتيجة	مكلفة نوعاً ما.
طريقة التشريح المرضي	تقييم الخزعة ودراستها والاستدلالات الأخرى المرتبطة بها.	مكلفة وتحتاج لوقت طويل
طريقة المعايرة بالفلورة (المعدلة)	رخيصة وغير مكلفة	إن كانت تعتمد على البراز فهي لا تميز بين الإصابة السابقة والجديدة أما بالطريقة المعدلة في بحثنا فهي تعتمد على أخذ المستعمرة مباشرة وتؤكد إيجابية المستعمرة.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن معظم عزلات جراثيم الملوية البوابية التي استطعنا عزلها بطريقة الزرع الجرثومي تعود لمرضى يعانون من القرحات الهضمية (36 عزلة) وذلك مقارنة مع عدد العزلات التي استطعنا عزلها من أشخاص لا يعانون من هذا المرض (2 عزلة)، وهذا ما يدعم كون جراثيم الملوية البوابية إحدى أهم مسببات القرحات (Osawa 2008, and Serin 2005, 7; Ozer 6327; Mario *et al.*, 2003, 1223)

وهذا ما يتوافق نسبياً مع دراسة قام بها الباحث Rn Misra وزملاؤه (Misra *et al.*, 2006,1) حيث بلغ عدد العزلات الإيجابية لجراثيم الملوية البوابية من مرضى مصابين بالقرحات المعدية (14) عزلة من أصل (62) مريض وعزلة واحدة من أصل (38) لمرضى لا يعانون من قرحات معدية وبكثي الدراستين نلاحظ أن نسبة عزل جرثومة الملوية البوابية من مرضى مصابين بالقرحات المعدية تكون أعلى بكثير من المرضى غير مصابين بالقرحات.

10. الاستنتاجات Conclusions

1. عزل جراثيم الملوية البوابية من المرضى المصابين بالقرحات المعدية بنسبة أعلى من المرضى الغير مصابين بالقرحات.
2. صعوبة تنمية جراثيم الملوية البوابية على الأوساط الزرعية بسبب عدة عوامل منها الظروف المعقدة للنمو والمواد المتممة وتناول المرضى الصادات الحيوية ومثبطات مضخات البروتون قبيل التنظير حيث اتسمت الزراعة على الأوساط نوعية عالية وحساسية منخفضة.
3. تعتبر طريقة اختبار أنزيم اليورياز والتشريح المرضي من الطرق ذات الحساسية العالية للتحري عن جراثيم الملوية البوابية لدى المرضى المصابين بقرحات معدية.
4. اعتبار وسط (BHI) الناقل للخزعة النسيجية من أفضل الأوساط.
5. انفرد البحث الحالي بتعديل طريقة المعايرة بالفلورة المناعية من خلال استبدال العينة البرازية بمعلق جرثومي من المستعمرة مباشرة وذلك لإثبات إيجابية المستعمرة واتسمت الطريقة بنوعية وحساسية مرتفعة جداً لكن لا تعد طريقة معتمدة للكشف السريع عن الإصابة إلا من خلال مستضدات الجرثومة في البراز وهنا يكمن الضعف بالبروتوكول المتبع حيث أنه لا يميز بين الإصابة الجديدة أو القديمة أو إن كان المريض بطور شفاء أو إصابة.

11. المراجع References

1. كيالي، نجيب، (2007). جودة النتائج المخبرية السريرية. مجلة التشخيص المخبري 4 (4).
2. Abdullah, M., L. Kamal, D. Ehab, and M. Khalid (2023). Assessment of Anti-*Helicobacter Pylori* Eradication Regimens in Basrah Gastroenterology and Hepatology Hospital. *Al-Rafidain J Med Sci.* 5: 34-36.
3. Archer, J. R., S. Romero, A. E. Ritchie, M. E. Hamacher, B. M. Steiner, J. H. Bryner, and R. F. Schell (1988). Characterization of an unclassified microaerophilic bacterium associated with gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 26: 101–105.
4. Erzooki, A. Y., and F. S. Manhal (2016). Evaluation of Real Time PCR, ELISA and Direct Strip Tests for Detection of *Helicobacter pylori* Infection in Patients with Gastrointestinal Illnesses. *British Journal of Medicine & Medical Research* 15(5): 1-9.
5. Blaser, M. J., and J. C. Atherton (2004). *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest.* 113(3): 321-333.
6. Boyanova, L. (2011). *Helicobacter pylori*. Journal Caister Academic press. ISBN 978-1-904455-84-4.
7. Christian, S. G., E. M. Eze, and J. E. Essor (2018). ABO, Rhesus blood groups and haemoglobin variants distribution among individuals with *Helicobacter pylori* in Igwuruta-Ali, Rivers State. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 2.
8. Crowe, S. E., (2013) Bacteriology and epidemiology of *Helicobacter Pylori* infection. Up to date 21(6).
9. Ernst, J., et al. (1996). Atrophic Gastritis and *Helicobacter pylori* Infection in Patients with Reflux Esophagitis Treated with Omeprazole or Fundoplication. *N Engl J Med.* 334: 1018-1022.
10. Farah, H., et al. (2015). Detection of *H. Pylori* by Different Conventional Staining Methods and Immunohistochemistry in Sudanese Patients with Chronic Gastritis. *Journal American Journal of Research Communication*, 3(2).
11. Han, S. R., H. E. Zschauch, H. W. Meyer, T. Schneider, M. Loos, and Maeurer, M. J. (2000). *H.pylori* cional population structure and restricted transmission with Into 6 families reveled by molecular typing. *J. Clin. Microbiol.* 38(10): 3646-3651.
12. Logan, R. P., and M. M. Walker., (2001). Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *BMJ.* 323 (7318): 920–2.
13. McNulty, C. A. M., and J. C. Dent., (1987) Rapid identification of *Campylobacter pylori* by performed enzymes. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1683-1686.
14. Manhal, F. S. (2016). Evaluation of Real Time PCR, ELISA and Direct Strip Tests for Detection of *Helicobacter pylori* Infection in References 998 Patients with Gastrointestinal Illnesses. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research.* 2.
15. Hassan, M., S, Negar., D, Hossein., and S, Meysam., (2012). Study of *Helicobacter pylori* genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples. *World J Gastroenterol.*7:18(17).
16. Martin, J. B., (1994). Introduction: Medical Significance of *H. pylori* *J. Clin. Microbial.* 132: 1799-1804.
17. Mario, F., A, M, Moussa., and P, Caruana., (2003). Serological biopsy' in first-degree relatives of patientswith gastric cancer affected by *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol.* 38: 1223–1227.
18. Misra, R.N., M, Bhagat., and N, Ahmed., (2006). *Helicobacter pylori* in Dyspepsia – Antibiotic Sensitivity and Virulence Patterns. *MJAFI.* 62 (1).
19. Neale, K, R., and R, P, Logan., (1995). The epidemiology and transmission of *Helicobacter pylori* in children. *Aliment Pharmacol Ther.* 2: 77-84.
20. Ndip, R, N., W, G, MacKay., and M, J, Farthing., (2003). Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 36: 616–622.

21. Olivier, B. J., et al. (2006). Absence of Helicobacter pylori within the oral cavities of members of a healthy South African community. Journal Clin Microbiol. 44: 635–636.
22. Owen, R. J., (1998). Hlicobacter – species Classfiacation and Identification. Brit Med Bull. 54(1): 17-30.
23. Ozer, B., E, Serin., Y, Gumurdulu., (2005) Helicobacter pylori eradication lowers serum homocysteine level in patients without gastric atrophy. World J Gastroenterol. 11: 2764-7.
24. Osawa, H., (2008). Ghrelin and Helicobacter pylori infection. World J Gastroenterol. 14: 6327-6333.
25. Reddy, B, S., P, J, Venkateswarlu., B, Naga., D, A, Renuka., (2015). Role of H. pylori in Gastroduodenal Diseases. Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences. 4(4): 581-586.
26. Sitkin, S., L, Lazebnik.,E, Avalueva., S, Kononova., T, Vakhitov., (2022). Gastrointestinal microbiome and Helicobacter pylori: Eradicate, leave it as it is, or take a personalized benefit–risk approach? World J Gastroenterol. 28(7): 766-774.
27. Siavoshi, F., et al. (2014). Vacuoles of Candida yeast as a specialized niche for Helicobacter pylori. 14;20(18):52 63-73.
28. Skirrow M.B.(1977). Campylobacter enteritis: a "new" disease. BMJ.2;2(6078):9-11.
29. Vyse, A, J., (2002). The burden of Helicobacter pylori infection in England and Wales. Epidemiol Infect. 128(3): 1-7.
30. Vijayad, D., and N, Chandrashekar., (2012). Simple Stain for Helicobacter pylori. JCDR. 4038: 0029.
31. Warren, J. R., and B, J, Marshall., (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet. 1273.
32. Zaghoul, M, Z., (2012). Helicobacter pylori. J Medical Microbiol Diagnosis. 2161-2170.