دراسة مقارنة بين بعض الطرق المستخدمة للتحري عن بكتريا المعدة الحلزونية لدى المرضى المصابين بأمراض المعدة والامعاء

مثنى عبدالقادر المهداوي* ، علي غازي الدليمي* و احمد علوان القيسي**

***جامعة ديالى -كلية للعلوم - قسم علوم الحياة**

****مستشفى بعقوبة التعليمي**

الخلاصة

هدفت الدراسة الى المقارنة بين بعض الطرق المستخدمة للتحري عن بكتريا المعدة الحلزونية *Helicobacter pylori* لدى المرضى المصابين بأمراض المعدة والامعاء وتقييم الطريقة الافضل، شملت الدراسة على (30) حالة مرضية لأشخاص مصابين بأمراض المعدة والامعاء. وكذلك شملت الدراسة (10) عينات من اشخاص غير مصابين بهذه الامراض (السيطرة). حيث امكن الحصول على هذه العينات (خزعات نسيجية و دم) من وحدة الناظور في مستشفى بعقوبة التعليمي للفترة (29 - 9 - 2015 الى 25 - 2 - 2016)، اظهرت النتائج ان الكشف الجزيئي بتقنية الـ PCR عن بكتريا *H. pylori* مباشرة في الخزعات النسيجية للمرضى جاء بأعلى نسبة بين الاختبارات الاخرى ويليه اختبار اليوريز (انظيم اليوريا) السريع للخزعة النسيجية، ومن ثم اختبار للتحري عن الأجسام المضادة (IgG) لبكتريا *H. pylori* في المصل (Serum) واقل نسبة للتحري عن هذه البكتريا كانت بواسطة اختبار الزرع البكتيري. كانت نسبة الكشف عن بكتريا *H. pylori* في مجموعة المرضى بواسطة الاختبارات السابقة هي 80%، 56.67%، 43.33%، 10% على التوالي، اظهرت نتائج التحليل الاحصائي على وجود علاقة معنوية $P \leq 0.001$ بين الاختبارات المستخدمة. بالاعتماد على نتائج هذه الدراسة نستنتج افضلية طريقة الكشف الجزيئي بتقنية الـ PCR عن بكتريا *H. pylori* اذ يكون ذو كفاءة عالية الخصوصية والحساسة للكشف عن هذه البكتريا مباشرة من عينات الخزعات النسيجية المعدية. وصعوبة استنبات بكتريا *H. pylori* من العينات المأخوذة من المصابين بأمراض المعدة والامعاء المتناولين للعلاجات المضادات الحيوية ومثبطات مضخة البروتونات PPI.

الكلمات المفتاحية: بكتريا المعدة الحلزونية، تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

دراسة مقارنة بين بعض الطرق المستخدمة للتحري عن بكتريا المعدة الحلزونية
لدى المرضى المصابين بأمراض المعدة والامعاء

مثنى عبدالقادر المهداوي ،علي غازي الدليمي و احمد علوان القيسي

Comparison Study Among Some Methods That Used For Detection of *Helicobacter pylori* In Patient's With Gastrointestinal Disease

Muthanna Abdulqader Al-Mahdawi* , Ali Ghazi Al-Dulaimi* and Ahmeed Alwan Al-Qaisi**

* University of Diyala - College of science - Biology department

**Baqubah Teaching Hospital

Received 25 August 2016 ; Accepted 18 September 2016

Abstract

The study aimed to comparison among some methods that used for detection *Helicobacter pylori* in patient's with gastroduodenal disease and evaluate the beast method. The study samples collected from endoscopy unit in Baqubah Teaching Hospital for the period (29-9-2015 to 25-2-2016). They study included 30 case patients with gasteroduodenal disease also it included a study on (10) samples of apparently healthy individuals (control) as comparison group. The results showed the detection of *Helicobacter pylori* directly from biopsy by Polymerase Chain Reaction (PCR) recorded heights percent among other tests which are included: rapid urease test for biopsy, Rapid anti *H. Pylori* test (IgG) and bacterial culture. The percentage of detection *H. Pylori* in patients group by these four tests were 80%, 56.67%, 43.33%and 10% respectively. There were significant differences ($P \leq 0.001$) among different tests. The present study concluded that the PCR technique is suitable for accurately detection of these bacteria directly from gastric biopsy specimens and the difficulty of culturing *H. pylori* from samples taken from patient's with gastroduodenal disease which handlers treatments of antibiotics and proton pump inhibitors (PPI)

Keywords: *Helicobacter pylori*, Polymerase Chain Reaction (PCR)

المقدمة

تعد البكتريا الحلزونية *Helicobacter pylori* اليفة لكميات الهواء القليل (Microaerophilic)، سالبة لصبغة غرام، حلزونية (1)، تمتاز بظاهرة تعدد الأشكال اذ قد تظهر بالشكل المكور والعصوي (forms Coccoid and bacillary) وتعد المسبب الرئيسي لحدوث تقرحات (Ulceration) المعدة و الاثني عشر و اصبحت هذه الامراض شائعة في الآونة الأخيرة نظرا لانتشار هذا النوع من البكتريا (2). تعتبر هذه البكتريا ذات إمراضيه عالية اذ تصيب اكثر من نصف سكان العالم (3) وتسبب العديد من الامراض منها التهاب المعدة المزمن (Chronic gastritis)، تقرحات المعدة والاثني عشر (Gastric and duodenal ulcers)، سرطان المعدة (Gastric cancer)، و سرطان الانسجة اللمفاوية المصاحبة للطبقة المخاطية (Mucosa-associated lymphoid-tissue lymphoma) (4). اجرى العديد من الباحثين في العراق دراسات على هذه البكتريا، تضمنت استنباتها من الخزعة النسيجية المأخوذة من المعدة او تحديد الاجسام المضادة المتولدة ضدها في مصل الدم (5). وتستخدم العديد من الطرق للكشف عن بكتريا *H. pylori* تقسم بالاعتماد على استخدام او عدم استخدام جهاز الناظور (Endoscopy) .و تشمل الفحوص التي تتطلب وجود خزعة نسيجية (Biopsy) كل من تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) ، الزرع البكتيري (Bacterial culture) ، اختبار اليوريز السريع (RUT)، والفحوصات النسيجية (Histological tests)، اذ تجرى جميع هذه الاختبارات على الخزعة النسيجة المستأصلة بواسطة الناظور وتسمى بالفحوص الاجتياحية Invasive procedures (6). اما الاختبارات التي تتم بدون استخدام الناظور وتشمل اختبار المستضد البرازي (Stool antigen tests) ، اختبارات مصلية (Serological tests) ، واختبار الكشف عن الزفير بعد تناول اليوريا (Urea breath test) و تعتبر هذه الاختبارات غير اجتياحية (Non-invasive procedures) (7). تهدف هذه الدراسة الى المقارنة بين بعض الطرق المستخدمة للتحري عن بكتريا *H. pylori* وتقييم الطريقة الافضل.

المواد وطرائق العمل

1- جمع العينات

أجريت هذه الدراسة للفترة (30 - 9 -2015 الى 25 - 2 – 2016) في شعبة الناظور التابعة لمستشفى بعقوبة التعليمي، وتم إجراء فحص الناظور لأربعين شخص محالين إلى شعبة الناظور من قبل أخصائيين في الجراحة العامة والباطنية، وكانوا يعانون من عسر الهضم والم اعلى البطن ونزف معوي وتقيؤ واعتماداً على فحص الناظور قسمت عينة الدراسة إلى مجموعتين:

A- مجموعة السيطرة (الذين لم يشخص لديهم أي من امراض المعدة والامعاء) وعددهم (10) اشخاصControl group

B - مجموعة المرضى (الذين شخص لديهم احد امراض المعدة والامعاء) وعددهم (30) مريضا Patients group

أخضعت كلا المجموعتين لاستئصال الخزع النسيجية حيث تم اخذ ثلاثة خزعات نسيجية من اماكن مختلفة لغار المعدة وبعد الحصول على الخزعات النسيجية تم مجانستها واجريت عليها الاختبارات التالية: اختبار اليوريز السريع Rapid

urease test، اختبار الزراع البكتيري Bacterial culture test واستخلاص الدنا DNA من الخزعة النسيجية للكشف عن بكتريا *H. pylori* عن طريق الجين 16SrRNA بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR. و أخذت نماذج الدم من كلا المجموعتين وتم فصلها بواسطة جهاز النبذ المركزي للحصول على المصل (Serum) وذلك للتحري عن الأجسام المضادة IgG لبكتريا *H. pylori* باستخدام اختبار عدة الخطوة الواحدة(One Step *H. pylori* Test Device Kit) .

2- الاوساط الزرعية

2-1 وسط سكرو Skirrow's medium

استخدم هذا الوسط لغرض العزل الأولي لبكتريا *H. pylori* ، إذ حضر هذا الوسط من وسط أغار الكولومبيا، ثم أضيفت خليط المواد معززة للنمو (Growth Supplement) التي تألفت من ثلاثة مواد هي (FBP) (Ferrous sulfate, sodium meta Bisulfite, and sodium Pyruvate) وأضيف محلول السكيروز (Skirrows Supplement III) والذي يتألف من خليط من بادر للمضادات الحيوية: (Vancomycin 5.00 mg , Polymyxin-B 1,250 IU , Trimethoprim 2.50 mg) إن هذا الوسط يمكننا من الحصول على مستعمرات مفردة وخالية من التلوث مما يجعله من الأوساط المفضلة في تشخيص بكتريا *H .pylori* عن غيرها من الأنواع البكتيرية (8).

2-2 وساط اغار الدم Blood Agar

استخدم هذا الوسط لتنقية المزرعة البكتيرية في اول خطوة بعد العزل الاولي (Primary isolation)، ولإدامة البكتريا ايضاً (9).

2-3 وسط نقيع القلب والدماغ Brain Heart Infusion Broth

أستعمل هذا الوسط لتنشيط نمو بكتريا *H. pylori* وحفظها بعد العزل ويكون مضافا اليه الغليسرول المعقم بنسبة 20% إلى 80 % من الوسط (10).

2-4 وسط اليوريا السائل Urea broth

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة، اذ توضع الخزعات النسيجية المأخوذة من المرضى في هذا الوسط.و تحضن بدرجة حرارة 37C° لمدة 24 ساعة . يلاحظ بعد ذلك تحول لون الوسط من الاصفر الى الوردي(11).

3 -الاستنبات

استخدمت طريقة بارسونيت وجماعته في زرع العينات (12) وعلى النحو الآتي :-بعد وصول العينات الى المختبر وخلال مدة لا تتجاوز الساعتين من الوقت تم سحق ومجانسة (Homogenization) عينات الخزعات النسيجية بوساطة جهاز معاملة النسيج (Homogenizer) جيداً حتى يتحول النسيج الى مزيج متجانس، يلقح وسط سكرو بـ(0.1) مليلتر من المزيج النسيجي، وبوساطة الناقل (Loop) يتم نشر اللقاح في الطبق بطريقة التخطيط (Streaking) وبمعدل طبقين لكل وسط، تنقلت بعدها الاطباق الى الوعاء اللاهوائي (Anaerobic Jar) ثم وضعت عدة تحرير الغاز (Gas generating kit) ونشطت بإضافة (10) مليلترات من الماء المقطر الى محتويات العدة، واغلق الوعاء بأحكام لغرض توفير الظروف الغازية

المطلوبة وهي: (5%) من غاز الاوكسجين، و (10%) من غاز ثاني اوكسيد الكاربون، و (85%) من غاز النيتروجين . وضع الوعاء اللاهوائي في الحاضنة في درجة (37) م لمدة (7 – 14) يوم وبعد انتهاء مدة الحضانة تم تشخيص البكتريا اعتمادا على مصنف بيرغي.

4- التحري عن الأجسام المضادة IgG لبكتريا *H. pylori* وذلك باستخدام اختبار عدة الخطوة الواحدة One Step *H. pylori* Test Device Kit

تم التحري عن الأجسام المضادة(IgG) لبكتريا *H. pylori* في مصول المرضى (المصابين بأمراض المعدة و الامعاء) ومجموعة السيطرة(الاصحاء) باستخدام عدة اختبار مناعي نوعي سريع وبخطوة واحدة لتعطي تشخيص مبدئي للإصابة بهذه البكتريا، و حسب تعليمات الشركة المجهزة (German-Acon)، وهو عبارة عن شريط به حفرة توضع فيها 3 قطرات من مصل المريض (الحاوي على الأجسام المضادةIgG المتكونة ضد البكتريا) الذي يتفاعل مع جزيئات مستضد البكتريا المغلفة لسطح الحفرة، هذا التفاعل يؤدي إلى تغير لون الخط الذي يظهر في منطقة الفحص (Test) مما يدل على ايجابية الاختبار ، في حين عدم ظهور الخط الأحمر في هذه المنطقة يدل على سلبية الاختبار وعند إجراء الاختبار للسيطرة نلاحظ تلون الخط في منطقة خط السيطرة (Control) مما يدل إن كمية مناسبة من المصل تمت إضافتها ، وتحسب خلال 10 دقيقة بعدها تهمل، إن الحساسية لهذا الاختبار هي 99.0 % والنوعية 86.7 % (12).

5- التشخيص بتقنية الـ PCR

1-5 استخلاص الدنا الجينوم من النسيج Extraction of Genomic DNA (Tissue)

تم استخلاص الدنا الجينوم بواسطة عدة الاستخلاص (Geneaid extraction genomic DNA kit) حيث أذيبت عينات الخزعات النسيجية (Biopsy) المجمدة لدرجة حرارة الغرفة واستخلص الدنا DNA حسب التعليمات المثبتة في طريقة العمل، وتم تقدير نقاوة الدنا DNA بواسطة جهاز القطرة النانوية.(13).

2-5 تحضير البادئPrimer Preparation

جهز البادئ من قبل شركة (Bioneer) الكورية على شكل (lyophilized) وبتراكيز مختلفة بالبيكومول (Picomole) . واذيبت هذه البادئ بالماء المقطر منزوع الاستقطاب (deionized distilled water) حيث يكون بتركيز نهائي(100 pmol/µl) ويحفظ عند (-20Cº) لحين الاستعمال . استخدم هذه البادئ بتحضير محلول (solution working) وذلك بأخذ حجم (10µl) من المحلول الخزين (stock solution) واضافته الى (90µl) من الماء المقطر منزوع الاستقطاب (ddH_2O) للحصول على تركيز (100µl) من محلول (working solution) (14).

جدول (1) البادئ الخاص بالجين 16SrRNA المستخدم للكشف عن بكتريا

Primer	Sequence		size	Source
16SrRNA	F	ATCCTGGCTCAGAGTGAACG	1500bp	(15)
	R	GCAGGTTCACCTACGGTTACC		

5- 3 التحري عن بكتريا *H .pylori* في الخزعات النسيجية بواسطة جهاز المبلمر الحراري الحلقي Thermocycler استخدمت هذه الطريقة للتأكد من وجود المادة الوراثية (DNA) لبكتريا *H .pyori* في الخزعة النسيجية (Biopsy) بواسطة الكشف عن الجين (16SrRNA) الخاص بهذه البكتريا ذلك باستخدام بادئ متخصص لمضاعفة هذا الجين والكشف عنه بواسطة الترحيل الكهربائي من خلال حجمه الذي يساوي (1500bp) وحضر وسط التفاعل حسب تعليمات الشركة المصنعة وذلك باستخدام العدة(PreMix Kit AccuPower® PCR). وباستخدام النظام (Convential PCR thermocycler system) الموضح في جدول (2).

جدول (2) برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل المستخدم لتضخيم الجين (16SrRNA)

PCR step	Temp.	Time	Repeat cycle
Initial Denaturation	95C	5min	1
Denaturation	95C	30sec.	30
Annealing	58C	30sec	
Extension	72C	2 min	
Final extension	72C	10min	1
Hold	4C	Forever	-

5-4 الكشف عن ناتج تفاعل الـ PCR وتقدير الأحجام الجزيئية لدنا

تم ذلك من خلال عملية الترحيل الكهربائي لعينات الدنا التي تم مضاعفتها بواسطة جهاز المبلمر الحراري (Thermocycler) باستعمال هلام (جل) الاغاروز بتركيز1.5% كما استخدم الدليل الحجمي (DNA ladder) ذو حجم 100-2000bp وذلك للتعرف على حجم الحزم الناتجة من تفاعل الـ PCR.

6- التحليل الاحصائي . Statistical analysis

اجرى التحليل الاحصائي باستخدام برنامج الحزمة الاحصائية (statistical package for social sciences) ذي الاصدار رقم22 (16).

النتائج والمناقشة

1- للحالات المرضية المشخصة بواسطة الناظور

لوحظ في فحص الناظور سيادة التهاب المعدة المزمن بنسبة (40%) وأتت قرحة الاثني عشر ثانيةً بنسبة (23.34%) في حين ظهرت قرحة المعدة بنسبة (16.67%) ، اما مرض الارتجاع المريء المعدة فكانت نسبته(13.33 %)وشكلت حالات سرطان المعدة اقل نسبة حيث كانت (6.67%)%). كما اظهرت النتائج وجود فرق معنوي ذو دلالة احصائية بين الامراض المختلفة حيث ان (P < 0. 04) وكما مبين في الجدول (3).

جدول (3) الحالات المرضية المشخصة بالناظور

الحالات المرضية		العدد	النسبة المئوية
التهاب المعدة المزمن	Chronic gastritis	12	% 40
قرحة الاثني عشر	Duodenal ulcer	7	%23.34
قرحة المعدة	Gastric ulcer	5	%16.67
مرض الارتجاع المريء المعدة	GERD	4	%13.33
سرطان المعدة	Gastric cancer	2	% 6.67
العدد الكلي	Total	30	100
P value		0.04*	

وقد اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة (17)، ان اختلاف نسبة الامراض المشخصة بواسطة الناظور قد يعود الى الاصابة ببكتريا *H. pylori* التي تبدء بالتهاب المعدة ومن ثم قرحة المعدة او الاثني عشر، وهناك بعض السلالات الضارية من هذه البكتريا قد تحفز حدوث مرض سرطان المعدة. او قد يعود ذلك على اختيار المرضى الذين أرسلوا إلى وحدة الناظور، فوعة (Virulence) سلالة بكتريا *H. pylori* التي تحدث الاصابة، ونوع و مدى استجابة العائل المناعية للإصابة بهذه البكتريا(18).

2- الاختبارات التشخيصية للكشف عن الاصابة ببكتريا *H. pylori*

2-1 اختبار اليوريز السريع للخزعة النسيجية Rapid urease test for biopsy

اظهرت 13 خزعة نسيجية نتيجة ايجابية لاختبار اليوريز السريع من بين 30 خزعة نسيجية لمجموعة المرضى وبنسبة 43.33% و17 خزعة نسيجية اعطت نتيجة سلبية لهذا الاختبار وبنسبة 56.67% في حين خزعة نسيجية واحدة فقط أظهرت نتيجة ايجابية من بين 10 خزعات لمجموعة السيطرة وبنسبة 10% و9 خزعات نسيجية اظهرت نتيجة سلبية وبنسبة 90. لقد وجد في هذه الدراسة فرق معنوي ذو دلالة احصائية عالية (P < 0. 01) بين مجموعتي الدراسة وكما موضح في الجدول (4) .

جدول (4) نتائج اختبار اليوريز السريع للخزعة النسيجية بين مجموعتي الدراسة

اختبار اليوريز السريع	النتائج الموجبة	النتائج السالبة	المجموع
مجموعة المرضى	(13)%43.33	(17) %56.66	(30)%100
مجموعة السيطرة	(1)%10	(9) %90	(10)%100
P value	0.01**		

وقد اتفقت هذه النتائج مع دراسة (19، 20).اذ يعتمد اختبار اليوريز السريع أساسا على عدد الخلايا البكتيرية في الخزعات وان أكثر من خزعة واحدة قد تعطي نتائج اختبار سريعة للغاية كما ان حجم الخزعة في حد ذاته قد يحدد عدد الخلايا البكتيرية داخل هذه الخزعات. ولقد اشارت الدراسات الى ان عدد المستعمرات الموجودة في الخزعات و اللازمة لإعطاء نتائج ايجابية لفحص اليوريز السريع يجب لا تقل عن 104 مستعمرة (21) كما ان للتوزيع البقعي patchy (distribution) لهذه البكتريا داخل بطانة المعدة دور في نسبة الكشف عن هذه البكتريا بهذا الاختبار (22) .

2-2 التحري عن الاجسام المضادة الخاصة بالبكتريا الحلزونية

بينت النتائج الايجابية التحري عن الاجسام المضادة (IgG) الخاصة ببكتريا *H. pylori* في عينات مصل الدم المأخوذة من مجموعة المرضى نسبة 56.67% (17عينة) وبنسبة 30% (3عينات) لمجموعة السيطرة اما النتائج السلبية فكانت 43.33%(13عينة) في مجموعة المرضى و 70%(7عينات) في مجموعة السيطرة ، لقد وجد في هذه الدراسة فرق معنوي ذو دلالة احصائية قيمتها ($P < 0.05$) بين مجموعتي الدراسة وكما موضح في الجدول (5).

جدول (5) التحري عن الاجسام المضادة (IgG) الخاصة بالبكتريا الحلزونية

Anti-*H.pylori* IgG	النتائج الموجبة	النتائج السالبة	المجموع
مجموعة المرضى	(17)%56.66	(13)%43.33	(30)%100
مجموعة السيطرة	(3)%30	(7)%70	(10)%100
P value	0.05*		

تبين نتائج الدراسة الحالية وجود اشخاص ضمن مجموعة السيطرة اعطوا نتائج ايجابية لاختبار التحري عن الاجسام المضاد (IgG) الخاص ببكتريا *H. pylori* ويمكن ان تعزى تلك النتائج الايجابية الى بقاء مستوى الاجسام المضادة من النوع (IgG) لعدة شهور بعد الشفاء من الاصابة (23). ومن جهة اخرى يمكن ان تعود النتائج السلبية لاختبار التحري عن الاجسام المضاد (IgG) الخاص ببكتريا *H. pylori* بين مجموعة المرضى الى ضعف الاستجابة المناعية لديهم. (24) وتنسجم هذه الدراسة مع دراسات عديدة في هذا المجال (25، 26، 27).

3-2 اختبار الزراعة البكتيرية Bacteriology Culture Test

اعطت ثلاث(3) خزعات نسيجية نتيجة ايجابية في الزرع البكتيري من بين 30 خزعة نسيجية لمجموعة المرضى وبنسبة 10% وكانت نسبة العينات السالبة للزرع البكتيري 90%(27عينة) في حين لم تعطي اي خزعة نسيجية نتيجة ايجابية من بين 10 خزعات لمجموعة السيطرة. حيث بينت هذه الدراسة عدم وجود فرق معنوي ذو دلالة احصائية عالية ($p>0.05$) بين مجموعتي الدراسة وكما موضح في الجدول (6).

جدول رقم (6) نتائج اختبار الزراعة البكتيرية للخزعة النسيجية بين مجموعتي الدراسة

اختبار الزراعة البكتيرية	النتائج الموجبة	النتائج السالبة	المجموع
مجموعة المرضى	(3)%10	(90)27%	(30) %100
مجموعة السيطرة	(0) %0	(10) %100	(10) %100
P value		0.08	

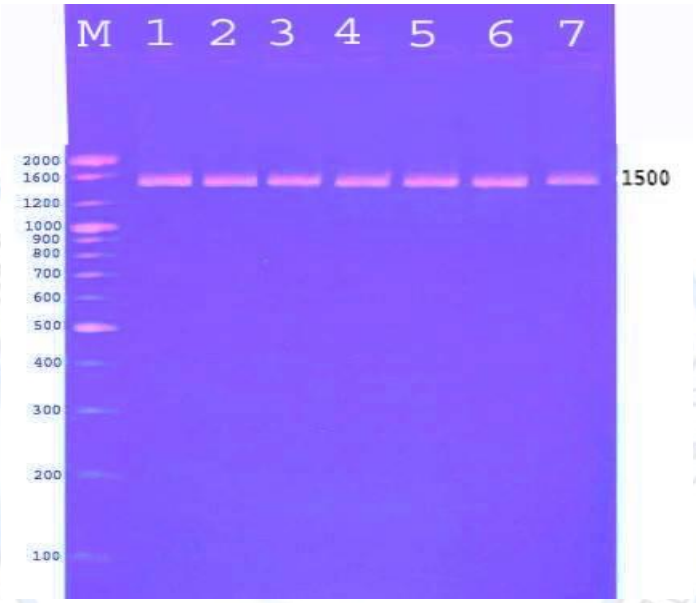
شخصت هذه البكتريا على انها *H. pylori* اعتمادا على مصنف برغي الذي يصنف مستعمراتها بكونها دائرية، صغيره، محدبة، شفافة، وتكون على شكل حرف (S) سالبة لصبغة غرام، وموجبة لاختبارات اليوريز والاوكسيديز والكاتليز تبين في هذه الدراسة ان اختبار الزرع البكتيري جاء بأقل نسبة مقارنة بالفحوصات الاخرى و ربما يعود ذلك الى الطبيعة الحساسة لهذه البكتريا (Fastidious nature of *H. pylori*) او بسبب المضادات الحيوية و مثبطات مضخة البروتونات Proton pump inhibitor (PPIs) التي تؤخذ من قبل المرضى (28) او بسبب بعض العوامل الاخرى مثل التوزيع البقعي (Patchy distribution) لهذه البكتريا داخل بطانة المعدة، السحق غير ملائم للخزعة النسيجية (Inadequate mincing of the biopsy) ، وجود النبيت الطبيعي (Flora) في الفم والبلعوم الذي ينافس هذه البكتريا في الخزعة النسيجية ويؤثر على نموها ، فقدان حيوية النموذج خلال عملية النقل. (29) . وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع النتائج التي حصل عليها (30، 31).

4-2 الكشف الجزيئي عن ببكتريا *H .pylori* في الخزعات النسيجية بوسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR باستخدام الجين 16SrRNA الخاص بها

اعتمد الكشف الجزيئي عن بكتريا *H. pylori* بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR من للكشف عن الجين (16SrRNA) والذي يكون على شكل حزم بحجم 1500pb زوج قاعدي الشكل (4) كانت موجبيه الفحص عن الجين (16SrRNA) الخاص ببكتريا 80 %(24 من 30 عينة) في المرضى المصابين بالأمراض المعدية وبنسبة 10%(1من 10 عينات) في مجموعة السيطرة لقد وجد في هذه الدراسة فرق معنوي ذو دلالة احصائية عالية ($P < 0.001$) بين مجموعتي الدراسة وكما موضح في الجدول رقم (8) .

جدول (8) نسبة موجبية الكشف عن الجين (16SrRNA) لمجموعتي الدراسة .

16srRNA	النتائج الموجبة	النتائج السالبة	المجموع	
مجموعة المرضى	(24)%80	(6)%20	(100)%30	
مجموعة السيطرة		(1) %10	(9)%90	(100)%10
P value		0.001***		



الشكل (3) الكشف عن ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR بواسطة الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز 1.5% لحزم الدنا للجين (16S *rRNA*) الخاص ببكتريا، والذي تم الكشف عنه من الدنا الجينوم المستخلص من نماذج الخزعات النسيجية المأخوذة من المعدة، حيث M يمثل حجم الدنا القياسي (100-2000bp)، و من (1-7) تمثل ايجابية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR والتي تظهر منتوج بحجم 1500bp زوج قاعدة.

تتوافق نتائج هذه الدراسة النتائج التي حصل عليها (32، 33). يعتبر الكشف عن الجين (16SrRNA) من الطرق واسعة الاستخدام للكشف عن بكتريا *H .pylori* في النماذج السريرية المأخوذة من المرضى (34).و ان طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR طريقة حساسة جداً للكشف عن مسببات الامراض مثل بكتريا *H .pylori* لكن التغيرات في تتابعات النيكليوتيدات لنفس الجينات بين سلالات مختلفة تابعة لنفس الجنس والنوع للكائن ربما تؤثر على معنوية النتائج، حيث ان التغيرات في تتابع النيكليوتيدات يمكن ان تحدث في موقع ارتباط البادئ لذلك تؤدي الى تثبيط تفاعل PCR واعطاء نتيجة سالبة كاذبة (False negative) ، او تؤدي الى تقليل كمية ناتج التفاعل (35). ولذلك تختلف نسبة ايجابية الكشف الجين(16SrRNA) الخاص ببكتريا *H. pylori* في الخزعات النسيجية من باحث لأخر.

الاستنتاجات

بالاعتماد على نتائج هذه الدراسة استنتجنا بأن افضل طريقة للكشف عن بكتريا *H .pylori* هو الكشف الجزيئي بتقنية الـ PCR حيث كان يكون ذو كفاءة عالية الخصوصية والحساسة للكشف عن هذه البكتريا مباشرة من الخزعات النسيجية للمرضى، وصعوبة استنبات بكتريا *H. pylori* من العينات المأخوذة من المصابين بأمراض المعدة والامعاء المتناولين للعلاجات المضادات الحيوية ومثبطات مضخة البروتونات PPI.

استخدم قاموس المعجم الطبي العربي الموحد في ترجمة المصطلحات العلمية الواردة في هذه الدراسة (36).

المصادر

1. Smyk, D.; Koutsoumpas, A.; Mytilinaiou, M.; Rigopoulou, E.; Sakkas, L. and Bogdanos, D. (2014). *Helicobacter pylori* and autoimmune disease: Cause or bystander. *World J. Gastroenterol.*, 20:613–629.
2. Nevine, M.; El Deeba, A. and Amany, y. (2015). An ultrastructural study of the association between Helicobacter pylori and the gastric mucosa. Egyptian Journal of Pathology, 35:1–13.
3. Mamoun, M.; Elsanousi, S. ; Khalid, A.; Abdelmounem E. and Mohamed A. (2015). Molecular Identification of 16s Ribosomal RNA Gene of Helicobacter pylori Isolated from Gastric Biopsies in Sudan. American Journal of Microbiological Research, 3(2): 50-54.
4. Franceschi, F.; Tortora, A.; Gasbarrini, G and Gasbarrini, A. (2014). Helicobacter pylori and extragastric diseases. Helicobacter. 1:52–58.
5. Jabbar, A. and AL-Obaidi, A. (2015). Isolation and Molecular Detection of Helicobacter Pylori from Biopsy Samples of Gastritis Patients in Iraq. International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB), 3(5):1-8.
6. Wang, y.; Chen, K.; Chung, L.; Meng, W. and Hsiang. S. (2015). Diagnosis of Helicobacter pylori infection. World J Gastroenterol , 21(40): 11221-11235.
7. Behnam, K.; Luca, F. and Markus, G (2015). Diagnosis of Helicobacter pylori Changes towards the Future. Diseases, 3, 122-135.

8. Skirrows, M. B.(2002). Campylobacter and Helicobacter : Enteritis ; Gastritis ; peptic ulcer In ″Medical Microbiology: ; a cuide of microbial infection : pathogenesis immunity , laboratory diagnosis and control″. Edited by Greenwood, D. ; Slack, R. C. B. and Peuthener, F. F. sixteenth edition . Churchill Livingaston. Part3; chap.29 ; p.288-295 .

9. Al-Sulami, A. (2008). Primary isolation and detection of from dyspeptic patients : Asimple rapid method. Eastren Mediterranean Heth Journal, 14(2):268-276.

10. Esaaeilli, D.; Mohabati, M.; Salmanian, A.; and Zavaran, H. (2009). Optimization of Helicobecter pylori culture in order to prepare favorable antigens. Iran journal of bacteriology research, 1(9):101-104.

11. Blanchard, Tand Nedrud, J. (2012). Maintenance of Helicobacter Species. American Journal of Microbiological Research, 5(3): 78-84.

12. Chen, T.; Chang, A. and Lee, D. (2002). Immunoglobulin G antibody against Helicobacter pylori clinical implications of levels found in serum. Clin Diagn Lab Immuno, 19:1044-8 .

13. Sambrook, J. and Russel, DW. (2001). Detection of DNA on agarose gel. In: Sambrook J, Russel DW (eds) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 514–518.

14. Ali, S. F. (2013): Detection of Helicobacter pylori in saliva from some Iraqi patients in comparison with other methods. M.Sc thesis, College of Science, Baghadad University.

15. Banerjee, H.; Gramby, M. and Hawkins, Z. (2014). Molecular Diagnosis of Helicobacter Pylori Strain by 16S rRNA PCR Amplification and Direct Sequencing. J Bioprocess Biotech, 1(10): 4172-4178.

16. Levesque, R. (2007) . SPSS Programming and Data Management , 4th ed . Chicago , pp:522.

17. Al-Dhaher, Z. A. (2001). Study of Some Bacteriological and Immunological Aspects of Helicobacter pylori. M. Sc.Thesis. College of Science. Al-Mustasiriyah University.

18. Zheng, Z. (2011). Molecular epidemiologic studies on Helicobacter pylori infection and stomach cancer risk. Helicobacter., 14:120-125.

19. Al-Jumaily, S.T.(2013):Immunological Study of Gastric-Ulcer Patients Infected with Helicobacter pylori. M.Sc thesis, College of Science, Al- Mustansyriah University.

20. Vaira, D.; Gatta, L.; Ricci, C. and Migloili, M. (2002). Review article: diagnosis of Helicobacterpylori infection. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 16: 125-130.

21. Marshall, B.; Warren, J.; Graham, J.; Langton, S and Goodwin, C. (1987): Rapid urease test in the management of Campylobacter pyloridis associated gastritis. Am. J. Gastroenterol, 82: 200-210.

22. Dandin, A.; Pawale, J. and Athanikar, V. (2012). Helicobacter Pylori Associated Gastritis. J. of Clin. and Diag. Res., 6: 211-214.

23. Goldsby, R.; Kinat, T; Osborne, B (2000): gene from Helicobacter pylori strains infecting patients at New York City Kuby immunology. 4th ed. W.H. Freeman and company (New York).

24. Oluwasola , A. and Ogunbiyi, J. (2004). Gastric cancer etiological, cilicopathology. Med., 12(4):177-86.

25. Alazmi, M.; Siddique, I.; Alateeqi, N and Al-Nakib, B.(2010): Prevalence of Helicobacter pylori infection among new outpatients with dyspepsia in Kuwait. BMC Gastroenterol.,10: 14-18.

26. Ebrahem, H. A. (2014): correlation between H. pylori infection with lipid profile, inflammatory markers and CIMT in patients with dyspepsia. Ph.D thesis, College of Medicine, Baghadad Univercity.

27. Al-Khatib, A. and Abu-zaiton, A.(2013):The prevalence of Helicobacter pylori among patients from abdominal pain European. Scientific Journal.,9(30): 1857–7881.

28. Thomas, C. ; Xiangwen, M.; Zhang, H. ; Rebecca,W. ; Tsang. and Tat-Kin, T. (2012). Comparing Multiplex PCR and Rapid Urease Test in the Detection of Helicobacter pylori in Patients on Proton Pump Inhibitors. Gastroenterol. Res.and Practice, Article ID 898276, 5 pages.

29. Kaore, N.; Nagdeo, N. and Thombare, V. (2012). Comparative Evaluation of the Diagnostic Tests for Helicobacter pylori. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 6(4): 636-641.

30. Radif and Saleh (2011). Effect of some chemical and physical factor on the coccishaper formation of Helicobacter pylori isolated from patient with duodenal ulcer. Iraqi journal of science, 52(3): 292-299.

31. Bakka, A. S.; EL- Gariain, A. B.; Aboughaara, F. M. and Salih, B. A. (2002). Frequency of H. pylori infection in despeptic patient in Libya. Saudi Mde. J., 23(10):1261-1265.

32. Johannessen, R.; Bergh, K.; Jianu, C. and Kleveland, P. M. (2013): Polymerase chain reaction versus culture in the diagnosis of Helicobacter pylori infection. Gastroenterol. Clin. Microbiol., 20 (2): 280-322.

33. Jabbar, A. M. and AL-Obaidi, L. A.(2015): Isolation and Molecular Detection of Helicobacter Pylori from Biopsy Samples of Gastritis Patients in Iraq. International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)., 3(5):1-8.

34. Espinoza, C. ; Vazquez, G. ; Mendez, M. ; Vargas, R. and Cerezo, G. (2011). Detection of the glmM Gene in Helicobacter pylori isolates with a novel primer by PCR. Clin. Microbial., 49 :1650 -1652.

35. Abu-Almaali, H. M.; Al-Khatabi, H. A.; Nasr-Allah , H. A. and Al-Khafaji, Z. M. (2102): Duplex PCR primers for detection of Helicobacter pylori DNA directly from gastric biopsy samples. Kerbala Journal Of Pharmaceutical Sciences, 3: 201-212.

36. Al-khayat, M. H. (2009). The Unified Medical Dictionary.4ed. Beirut, Lebanon.