

دراسة أمراضية بكتريا *Helicobacter pylori* في الفأر المختبري

*الدكتور ميثم غالي يوسف ، جمال كاظم

*جامعة القادسية / كلية العلوم/ قسم علوم الحياة

الخلاصة

تعدّ بكتريا اللولبيات البوابية *Helicobacter pylori* إحدى أهم مسببات المرضية لآخماج المعدة المزمن وقرحة المعدة وقرحة الأثنى عشري والتهابه، وسرطان المعدة والاورام المرتبطة بالطبقة المخاطية. جمعت عينات الخزع النسيجية المعدية وعينات اللعاب من (80) حالة مرضية خضعت لفحص الناظور 42 ذكور و 38 إناث من مختلف الفئات العمرية، في مستشفى الديوانية التعليمي للفترة من تشرين الأول 25- 2009 -10 وحتى آذار9- 3- 2010. شخّصت 77(96%) حالة مرضية. أخذت ثلاث خزعات من كل مريض من الطبقة المخاطية لغار المعدة Antrum للتحري عن بكتريا *H. pylori* استعملت واحدة لفحص اليوريز السريع والأخرى لعزل البكتريا على وسط الدنت الانتقائي DENT'S. أظهرت الدراسة كفاءة اختبار اليوريز السريع في التحري عن البكتريا، إذ استطاع ان يثبت وجود البكتريا في 43(54%) خزعة نسيجية، في حين تم عزل البكتريا من 18(23%) حالة مرضية بواسطة الزرع البكتيري وتحت ظروف قليلة التهوية، تم تنميط العزلات وراثيا باستعمال بواى متخصصة بالكشف عن الجين الذي يمثل المورث *UreaC* والمساوية (820) زوج قاعدي وتم ذلك باستعمال تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي Polymerase Chain Reaction (PCR) إذ تمت تنمية السلالات المحلية الفارزة لأنزيم اليوريز، ثم عزلت ونقيت المادة الوراثية الـ DNA منها لاستعمالها في التحري عن المورث *UreaC* المسؤول عن إفراز أنزيم اليوريز، أظهرت الدراسة المرضية النسيجية لبكتريا *H. pylori* في الحيوانات المختبرية (الفئران) BALB/c mice ظهور تغيرات نسيجية تنكسية شديدة شملت ظهور ارتشاح للخلايا الالتهابية منها الخلايا المتعددة الأنوية (Polymorph nuclear cells) وخلايا لمفية (Lymphocyte cells) خلايا البلازما (Plasma cells) في الصفيحة المخصوصة للطبقة المخاطية وما بين الغدد المعدية، كما ظهر تنكس مائي في الخلايا الظهارية للطبقة المخاطية والغدد المعدية الى درجة زيادة حجم الغدد Hypertrophy مع حدوث انسلاخات في الطبقة السطحية للجزء المخاطي وظهر حالة الاحتقان للأوعية الدموية مع ظهور حالة التفجى Vaculation في عدد من الخلايا الطلائية المعدية، فضلاً عن إظهار لحالة الضمور الخلوي وبداية حدوث التقرح Ulceration في مخاطية المعدة مقارنة مع مجموعة السيطرة التي لم تظهر أي تغير نسيجي.

المقدمة Introduction

تعدّ بكتريا *H. pylori* العامل الرئيس المسبب لحالات اخماج المعدة المزمن الفعال. Active Chronic Gastritis ويرتبط وجودها مع تطور قرح المعدة والاثنى عشري Peptic Ulcer كما وتعدّ عامل خطر في تطور سرطان المعدة Gastric Cancer والسرطان اللمفي المرتبط بالأنسجة المخاطية(1,2).

وتعدّ لوقت سابق من الجراثيم المعوية التي يصاب بها الإنسان عن طريق الانتقال البرازي أو الفموي- المعدي أو الفموي- الفموي أو بوجود مضيف وسطي مسببة بذلك الأمراض التقليدية معروفة كالتهاب المعدة والأمعاء وبعض حالات القرحة لكنها الآن شخّصت عالمياً بكونها بكتريا خطيرة ومسرطنه مرافقة للإصابات السرطانية والأورام الخبيثة للمعدة والأمعاء(3,4) حددت الدراسات الوبائية نسبة الخطر من (50% - 60%) يمكن ان يعزى إلى سرطان المعدة وبذلك صنفت منظمة الصحة العالمية (WHO) بكتريا *H. pylori* مادة متسرطنة من الدرجة الأولى للإنسان(5). أشار Souto وجماعته (6) ان بكتريا *H. pylori* تستعمر معدة ما يقارب نصف سكان العالم لكن الأغلبية العظمى من الأشخاص المصابين لا تظهر عليهم الأعراض.

تعتمد الأمراض المتسببة عن الاصابة بهذه البكتريا كالتهاب المعدة وقرحة المعدة والتهاب وقرحة الاثنى عشري والأورام اللمفاوية المعدية على التفاعل بين إصابة البكتريا للمضيف والبيئة أي إن هناك توزيعاً جغرافياً لمختلف سلالات بكتريا *H. pylori* والتي تختلف في التركيب الوراثي وعوامل الضراوة (7). تختلف طرائق تشخيص بكتريا *H. pylori* مع اختلاف حساسيتها وخصائصها اجتياحية والتي تعتمد عملية التنظير Endoscopy والخزعات النسيجية Biopsies أما الطرائق اللإجتياحية والتي لا تعتمد عملية التنظير والخزعات النسيجية لا جرائها (8) وتعدّ الطرائق التشخيصية القياسية الأكثر شيوعاً لبكتريا *H. pylori* هي الطرائق الإجتياحية لتحديد البكتريا إلا إنها تواجه صعوبات مختلفة ومتنوعة وبذلك تأتي أهمية الطرائق اللإجتياحية (9). من الصعوبات التي تواجه كل من الطرائق الإجتياحية والطرائق اللإجتياحية حفز الاهتمام

بالتقنيات الجزيئية في تشخيص الإصابة البكتيرية، ومن هنا ظهرت أهمية تقنية الـ PCR التي تفردت بحساسيتها وخصوصيتها العالية في التشخيص، وتملك هذه التقنية قوة ودقة في تحديد كل من وجود الإصابة والتركيب الوراثي الخاصة بالبكتيريا. (10). كما إن لهذه التقنية فائدة كبيرة في قدرتها على تشخيص هذه البكتيريا من دون الحاجة إلى عملية تنظير فأصبح بالإمكان الكشف عن الحامض النووي الـ (DNA) الكروموسومي لهذه البكتيريا في السوائل كالعصارة المعوية Gastric Juice واللعاب Saliva والمرضى المصابين فضلاً عن البحث عن الحامض النووي الـ (DNA) لهذه البكتيريا في أنسجة المعدة ومن براز الأشخاص المصابين بوساطة استعمال بادئات Primers خاصة أو عامة لجينات الالتصاق والجينات المسؤولة عن فعالية إنزيم اليوريز وجينات (16sRNA) أو باستعمال بادئات خاصة بالجينات المرضية (Pathogenesis Island gene) (11,12). مما تقدم ونتيجة للخطورة الناجمة عن بكتيريا اللولبيات البوابية وعلاقتها بالأمراض الخطرة جاءت فكرة دراسة طرائق تشخيص البكتيريا بوصفها مسبباً رئيسياً للقرحة الهضمية وعلاقتها بإنتاج إنزيم اليوريز المقاوم لحموضة المعدة والذي يعد بمثابة خطوة أساسية في أمراض البكتيريا. أجريت هذه الدراسة لغرض عزل بكتيريا *H. pylori* من مرضى قرحة الجهاز الهضمي ودراسة أمراضيتها في الفأر المختبري وفقاً للخطوات التالية:

1- عزل بكتيريا *H. pylori* وتشخيصها من المرضى المصابين بالتهاب المعدة أو قرحتها و التهاب الاثني عشري أو قرحته وسرطان المعدة.
2- استعمال تقنية الـ PCR في عملية التشخيص الجزيئي من الزرع البكتيري عن طريق استعمال بوادئ متخصصة وذلك لتأكيد تشخيص البكتيريا.

3- دراسة أمراضية بكتيريا *H. pylori* من خلال تجريعها في حيوانات مختبرية لمعرفة الضرر النسيجي الحاصل.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات Sampling collection

• جمعت العينات من وحدة الناظور في مستشفى الديوانية التعليمي للمدة من 2009/10/25 ولغاية 2010/3/9 ومن كلا الجنسين للفئة العمرية (80-16) سنة وكما يلي.

• جمعت (80) عينة من عينات اللعاب Salvia من مرضى مصابين بالتهاب أو قرحة المعدة والتهاب أو قرحة الاثني عشري، إذ تم اخذ العينة قبل إعطاء المريض مادة المخدر البلعومي، وبحجم (3) مل وتحفظ بالتجميد لحين الاستعمال في عملية التشخيص المباشر بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction.

• جمعت (80) عينة من عينات الخزعات النسيجية (Biopsies) بالوقت نفسه ومن المرضى أنفسهم حيث استأصلت ثلاث خزعات نسيجية من المريض من منطقة غار المعدة Antrum بوساطة الملقط الخاص Forceps بجهاز الناظور Endoscope، استخدمت مادة الزايلوكاين Xylocaine لغرض التخدير الموضعي للمريض.

• وضعت الخزعات النسيجية في أنابيب زجاجية معقمة حاوية على (1) مل من وسط (URT) (Oxoid) لغرض إجراء اختبار أنزيم اليوريز السريع، في حين وضعت الخزعات المخصصة للعزل في أنابيب بلاستيكية حاوية على المحلول الفسيولوجي وحفظت الأنابيب في صندوق مبرد لحين الاستعمال خلال مدة لا تتجاوز الساعتين.

زرع العينات Culturing

استعملت طريقة بارسونيت وجماعته (13) في زرع العينات

بعد إيصال العينات إلى المختبر وخلال مدة لا تتجاوز الساعتين وأقصى حد (4) ساعات عمل ما يأتي:

وضعت الخزعات النسيجية المخصصة لعزل البكتيريا (خزعتان لكل مريض) على شريحة زجاجية نظيفة ومعقمة، وقطع كل منها إلى قطع اصغر باستعمال مشرح معقم ومزجت جيداً، نقل جزء من المزيج الخزعي النسيجي وبوساطة الناقل (Loop) وزرع على الوسط الانتقائي (DENT) بطريقة التخطيط Streaking وبمعدل مكررين لكل عينة نسيجية، وضعت الأطباق في وعاء لا هوائي معقم (Anaerobic Jar) تتوافر فيه الظروف قليلة التهوية (Microaerophilic Condition) الخاصة بهذه البكتيريا.

توليد الظروف مقلة الهواء Microaerophilic condition

تم توفير الظروف قليلة التهوية باستعمال عدة تحرير الغاز (Gas generating Kit) المجهز من شركة (Oxoid) وضع مباشرة في الوعاء اللاهوائي، كما وفرة الرطوبة داخل الوعاء وتم ذلك بوضع قطن مبتل، أغلق الوعاء بإحكام وذلك لتوفير الظروف الغازية المطلوبة وهي

غاز الأوكسجين (O₂) وغاز ثنائي أوكسيد الكربون(CO₂) وغاز النتروجين (N₂) والذي يضخ إليه من مصدر خارجي، وضع الوعاء اللاهوائي المحكم في الحاضنة Incubator بدرج حرارة (37)م° ولمدة (3-5) أيام(14).
بعد انتهاء مدة الحضانة تم ملاحظة المزارع البكتيرية النامية على الأوساط الزرعية وشخصت مجهرياً ومزرعياً وكيموحيوياً وفق الطرائق التشخيصية المعتمدة.

تشخيص بكتيريا *H. pylori*

شخصت مستعمرات هذه البكتيريا مظهرياً على أساس شكل المستعمرات وترتيبها، تم التشخيص بالاعتماد على مصنف بيرغي (15).

اختبار إنزيم اليوريز السريع للخزعات النسيجية Rapid Urease Test of Biopsy

اتبعت طريقة (16) كما يأتي:

بعد استئصال الخزعة النسيجية من المريض وضعت مباشرة في وسط (URB) المحضرقيد الدراسة، وقرأت النتيجة خلال (10) دقائق من خلال تكون اللون الأحمر المعبر عن فعالية أنزيم اليوريز، في حالة عدم تغير اللون تحضن الأنابيب في درجة حرارة (37)م° لمدة (1-24) ساعة وتعد النتيجة موجبة في حالة تغير لون الوسط من اللون الأصفر إلى اللون الأحمر أو الأحمر الأرجواني.
التنقية والإدامة

تنقية عزلات بكتيريا *H. pylori* باستعمال وسط أغار الدم (Oxoid) (Blood agar) ووسط مرق نقيع الدماغ – القلب – الدماغ (Brain – Heart infusion Agar) وذلك بأخذ مستعمرة بواسطة الناقل المعقم من أطباق العزل الأولي Primary Isolation بعد إن تم تشخيصها وزرعت بواسطة التخطيط على الوسط، ثم وضعت الأطباق والأنابيب في وعاء لا هوائي (Anaerobic Jar) مجهزة بشمعة ويغلق الوعاء جيداً ووضع في الحاضنة Incubator في درجة حرارة (37)م° ولمدة (24-48) ساعة.

حفظ العزلات البكتيرية

نميت عزلات بكتيريا *H. pylori* المراد حفظها على وسط أغار الدم في درجة حرارة (37)م° ولمدة (24) ساعة، ثم زرعت على وسط نقيع الدماغ – القلب الحاوي على الغليسرول بنسبة (20%) وحفظت بدرجة حرارة (-20)م° (17).

التشخيص باستعمال تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي Polymerase Chain Reaction (PCR)

المحاليل المستعملة في تقنية الـ PCR

محاليل الترحيل الكهربائي Solutions of Electrophoresis

حضرت محاليل الترحيل الكهربائي حسب طريقة (18) وكالاتي:

محاليل استخلاص الـ DNA DNA Extraction Kit

استعملت عدة استخلاص وتنقية الـ DNA (DNA – sorb – B) والمجهزة من قبل شركة Sacace biotechnologies الايطالية .

عدة تشخيص بكتيريا *Helicobacter pylori* بالتفاعل البلمرة المتسلسل -DNA PCR Detection Kit *Helicobacter pylori*.

عدة التشخيص Diagnostic Kit تتضمن Go Tag Green Master Mix والمجهزة من قبل شركة Promega الأمريكية والتي تتضمن:

• Green Master mix, 2x.

• Nuclease Free Water.

الـ Green Master mix, 2x تتضمن:

• إنزيم البلمرة Taq DNA Polymerase.

• كلوريد المغنيسيوم (3mm) MgCl₂.

• صبغات التحميل الصفراء والزرقاء Yellow and Blue as loading dye.

• deoxyNucleotidesTriphosphates(dNTP_s) والتي تتضمن (400) مايكرومول لكل من (dTTP, dCTP, dGTP, dATP).

حفظت عدة التشخيص بدرجة حرارة (-20)م لحين الاستعمال.

البادئ الخاص المستعمل في عملية التضخيم

Specific Primer Sequence used for PCR amplification

استعمل البادئ النوعي المبين تتابعه في الجدول (1) في تحديد التسلسل الخاص للقطعة الجينية (Urea C) والتي تشفر لبناء إنزيم اليوريز

لبكتيريا *H. pylori* طبقاً لـ (Yoon *et al.*, 2001) والذي جهز من قبل شركة (Alpha – DNA – Canada).

جدول (1): تتابع البادئ الخاص المستعمل

Primer	Nucleotide Sequence	Length (bp)	TM ^o	size of PCR Products (bp)
Urea C ₁	F-5'TGGGACTGATGGCGTGAGGG'3	20	66	=820
Urea C ₂	R-5'AAGGGCGTTTTAGATTTTT'3	20	52	

تحضير هلام الاغاروز Agarose Gel preparation

استعمل هلام الاغاروز في الترحيل الكهربائي حسب طريقة (18)

حضر هلام الاغاروز بتركيز (1% و 1.5%) بحسب الحاجة، التركيز (1%) من هلام الاغاروز استعمل في الترحيل الكهربائي بعد

عملية تنقية واستخلاص الحامض النووي منقوص الأوكسجين الـ DNA بينما استخدم التركيز (1.5%) من هلام الاغاروز لنواتج الـ PCR.

وسط اللوريا برتاني السائل (Luria – Bartani Broth (LB)

استعمل هذا الوسط في تهيئة البكتريا للتشخيص بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل الـ PCR لبكتيريا *H. pylori* والذي حضر حسب طريقة

(1982) Maniatis *et al.* بإذابة (1gm) من التربتون (Tryptone) و(0.5 غم) من خلاصة الخميرة (Yeast extract) و(0.5 غم) من

ملح كلوريد الصوديوم (NaCl) و(0.1 غم) من الكلوكوز في (100)مل من الماء المقطر، وضبط الأس الهيدروجيني الـ PH على (7.5) وعقم

بالموصدة.

طرائق العمل الخاصة بتقنية الـ PCR

طريقة عمل استخلاص الـ DNA وتنقيته: اتبعت طريقة العمل الخاص بعدة الاستخلاص والثبة من قبل الشركة.

الكشف عن الحامض النووي منقوص الأوكسجين (DNA)

استعملت طريقة الترحيل الكهربائي Electrophoresis باستعمال هلام الاغاروز الـ (Agarose) للكشف عن الحامض النووي

منقوص الأوكسجين

طريقة العمل للترحيل الكهربائي حسب طريقة (18)

طريقة عمل تفاعل البلمرة المتسلسل الـ Polymerase Chain Reaction

استعملت تقنية الـ PCR لتضخيم جين (Urea C) Amplification بالاعتماد على طريقة العمل الخاصة بعدة التشخيص. واستعمل

البادئ كما موضح في جدول (1).

أجريت طريقة العمل بحجم (50) مايكرو لتر وكما موضح في الجدول (2) اعتماداً على النشرة المرفقة Green Master Mix المصنع من

قبل شركة Promega بأنبوب الـ PCR

جدول (2): إجماع المواد الكيماوية المستعملة في التفاعل

الحجم	المواد الكيماوية
25 µl	Go Tag Green Master Mix
2.5 µl لكل جين	Primer for Ward
2.5 µl لكل جين	Primer Reverse
5 µl	DNA

أكمل الحجم إلى 50	Nuclease – Free Water
50 µl	المجموع

بعد إتمام الإضافات جميعها مزجت العينات مركزياً بواسطة جهاز الطرد المركزي الخاص بآب PCR ونقلت العينات إلى جهاز المبلر الحراري الحلقي PCR thermal cycler وضبط برنامج عمل الجهاز كالآتي:

عدد الدورات	الزمن	درجة الحرارة	الخطوات	رقم الخطوة
1	5 min	95°	Initial enaturaion	1
35	1 min	95°	Denaturation	2
	1 min	45°	Annealing	3
	1.5 min	72°	Extension	4
1	10 min	72°	Final	5

الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية الـ PCR

اتبعت طريقة الترحيل الـ DNA المستخلص ولكن استعمل هلام الأغاروز بتركيز (1.5%) مع صبغة الـ Ethidium bromide لعرض نتائج الـ PCR، إن ظهور حزمة عند القاعدة الزوجية (820pb) يشير إلى جين Urea C. دراسة أمراضية بكتيريا *H.pylori* بواسطة الحيوانات المختبرية اتبعت طريقة (20) لدراسة أمراضية بكتيريا *H. pylori* بواسطة الحيوانات المختبرية وكما يأتي:

الحيوانات المستعملة في التجربة Experimental animal model

استخدمت في هذه التجربة (15) من ذكور الفئران البيض Balb/C Mice وبأعمار تتحصر بين (8-12) أسبوع، قسمت على ثلاث مجاميع احتوت كل مجموعة على ثلاث فئران فضلاً عن مجموعة السيطرة. تحضير العالق البكتيري

زرعت العزلة *H. pylori* في (100) مل من وسط نقيع الدماغ – القلب المدعم بمصل دم الحصان، وحضنت لمدة (72) ساعة في درجة حرارة (37)م وفي ظروف أليفة الهواء القليل، ثم نبذ المزروع البكتيري مركزياً بسرعة (6000 دورة/دقيقة) ولمدة (30) دقيقة ثم غسلت الخلايا المجموعة مرتين باستعمال محلول داري الفوسفات الملحي (PBS) ذي الأس الهيدروجيني الـ (7.2)، ثم علق الراسب بكمية مناسبة من محلول الغسيل ليعطي امتصاصية قيمتها (1) بجهاز المطياف Spectrophotometer وعلى طول موجي (625) نانوميتر للحصول على عالق البكتيري بتركيز (1×10⁸ خلية/مليتر).

تجريب الحيوانات المستعملة في التجربة

تم تهيئة الحيوانات للمعاملة بعد تركها مدة (4) أيام للتطبع في ظروف التجربة، ثم جرعت الحيوانات فموياً Orally بواسطة التقطير وجرع حجمها (100 µl) من اللقاح البكتيري الحاوي على (10⁸ خلية بكتيرية/مل) لبكتيريا *H. pylori* في حين لقحت مجموعة السيطرة بنفس الحجم من المحلول الفسيولوجي Normal Saline مع مراعاة تجويع Fasting الحيوانات قبل إعطاء الجرعة وأعطى اللقاح مرتين وبواقع مرة واحدة لكل يومين.

تصميم التجربة Experiment Design

قسمت حيوانات التجربة بين مجموعتين رئيسيتين وكما يأتي:

- مجموعة السيطرة: تم تجريعها المحلول الفسيولوجي، استخدمت بوصفها حيوانات مقارنة عند تشريح كل مجموعة.
- مجموعة الحيوانات المعاملة: تم تجريعها باللقاح البكتيري بالوقت نفسه وقسمت هذه المجموعة إلى ثلاث مجاميع كل مجموعة تحوي على ثلاثة حيوانات شرحت حيوانات هذه المجموعة في المدة ما بين (2-3-4) أسبوع.

دراسة الأعراض السريرية

تمت مراقبة الحيوانات يومياً شملت نشاط الحيوان وحركته وشهيته للأكل.

الدراسة النسيجية المرضية Histopathological Study

شربت الحيوانات وذلك بعد تخديرها بمادة الكلوروفورم بطريقة الاستنشاق بعد (2-3-4) أسابيع من إعطاء الجرعة فضلاً عن تشريح حيوان واحد من مجموعة السيطرة عند تشريح كل مجموعة من المجاميع الثلاث. استأصلت المعدة (Stomach) ثم أخذت عينات الخزعات من منطقة غار المعدة بعد تشريحها ووضعت في أنابيب تحوي على محلول الفورمالين بتركيز (10%) لتثبيت الخزعات النسيجية والحفاظ عليها لحين تحضير المقاطع النسيجية.

اعتمد على طريقة (21) لعمل المقاطع النسيجية للخزعات المأخوذة من المعدة قيد الدراسة

النتائج

أظهرت نتائج فحص الناظور ان 77(96%) من المرضى لديهم حالات مرضية مختلفة، شملت التهاب المعدة المزمن والتهاب المعدة وقرحة المعدة، بينما ثلاث حالات منهم 3(3.75%) كانت نتائج الفحص لديهم طبيعية (جدول 3).

جدول (3): نتائج فحص الناظور للمرضى المشمولين بالدراسة

ت	الحالة المرضية المشخصة بفحص الناظور	العدد	النسبة المئوية
1	التهاب المعدة المزمن Active CHRONIC GASTRITIS	29	36%
2	التهاب المعدة Gastritis	22	27.75%
3	التهاب الاثني عشري Duodenitis	7	8.75%
4	قرحة المعدة GASTRITIS ULCER	10	12.5%
5	قرحة الاثني عشر Duodenal ulcer	6	7.5 %
6	سرطان المعدة Gastritis cancer	3	3.75%
7	عدم ظهور حالة مرضية NORMAL	3	3.75%
8	TOTAL العدد الكلي	80	100%

إذ يتضح من الجدول أن أعلى نسبة إصابة في المرضى هي في حالة التهاب المعدة المزمن الفعال إذ سجلت 29 حالة وبنسبة (36%)، بينما سجلت أقل حالة إصابة تم تسجيلها هي في سرطان المعدة إذ سجلت 3 حالات مرضية فقط وبنسبة (3.75%).

العزل والتشخيص Isolation And Identification

عزلت بكتريا *H. pylori* من (18) حالة مرضية وبنسبة (23%) من عينات الخزع النسيجية للمرضى المصابين بالبكتريا (جدول 4) حيث عزلت هذه البكتريا على وسط العزل الأولي وسط (DENT'S MEDIUM) الانتقائي، شخضت العزلات اعتماداً على الفحوصات المتبعة لهذا الغرض وهي شكل المستعمرات و التصبغ بملون غرام واختبار اليوريز و اختبار إنزيمي الكاتليز و الاوكسيديز واختبار الحركة، كما أخضعت العزلات لاختبارات أخرى فضلاً عن اختبار النمو في درجات الحرارة (25)م و (42)م .

جدول (4): نتائج الزرع البكتيري لـ 80 مريض بقرحة الجهاز الهضمي

ت	الحالات المرضية المشخصة بالناظور	العدد	الزرع البكتيري Culture
			+ve%
1	التهاب المعدة المزمن	29	7(24%)
2	التهاب المعدة	22	1(6%)
3	قرحة المعدة	10	4(40%)
4	التهاب الاثني عشر	7	1(14%)
5	قرحة الاثني عشر	6	3(50%)
6	سرطان المعدة	3	2(67%)

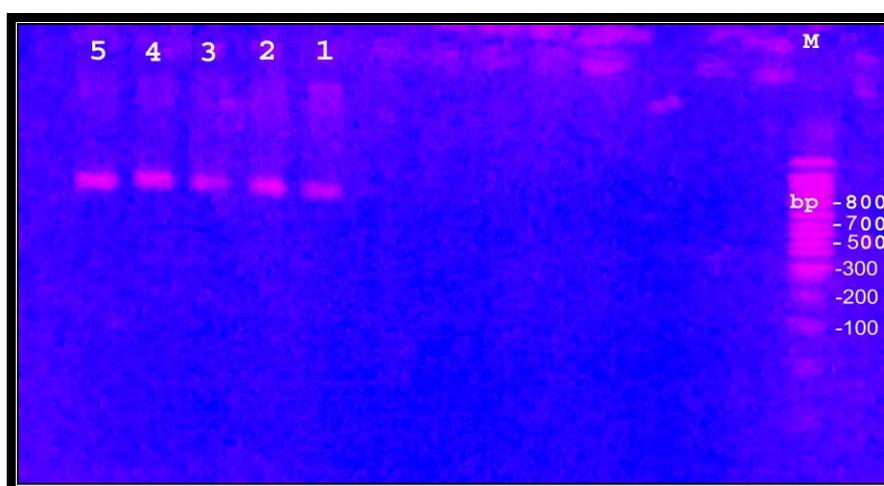
7	عدم ظهور حالة مرضي	3	0(%)
8	العدد الكلي	80	18(23%)

التشخيص بتقنية (PCR) DIAGNOSIS BY PCR

تشخيص عينات الخزعات النسيجية المعدية بتقنية الـ PCR

بعد عزل 18(23%) عذلة من عينات الخزعات النسيجية المعدية Gastric BIOPSIES من مجموع (80) مريض اخضعوا لفحص التنظير Endoscope TEST حيث أعطوا نتائج موجبة لفحص التنظير.

أجرى اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لـ 18 عذلة لبكتريا *H. pylori* والتي تم الحصول عليها بعد العزل الأولي لهذه البكتريا وذلك للكشف عن المورث Urea C GENE و أظهرت نتائج الدراسة أن 89% من العزلات كانت تحمل Urea C GENE وبوزن جزيئي (bp820) (شكل1).



شكل (1):الترحيل الكهربائي على هلام الاغاروز لنواتج تضاعف الـ PCR لعزلات *H. pylori* بوجود الدليل الموجب.

5,4,3,2,1: جين Urea C الموجود في عزلات بكتريا *H. PYLORI* المعزولة من المرضى المصابين

M: الدليل الموجب Ladder DNA

فحص اختبار الإمراضية لبكتريا *H. pylori* في الحيوانات المختبرية

تحديد استعمار بكتريا *H. pylori* لمعدة الحيوانات المجرعة

بعد تجريع الحيوانات المختبرية بجرعة (10^8 خلية بكتيرية/مل) من اللقاح البكتيري لبكتريا *H. pylori* حدد الاستعمار البكتيري في المجاميع المجرعة بواسطة تقدير فعالية إنزيم اليوريز للبكتريا في اختبار اليوريز السريع (RUT)، والتجارب البكتريولوجية المتمثلة بالزراعة Culture والاختبارات الكيموحيوية Biochemical TEST فضلاً عن التصبغ بملون غرام.

بعد مرور الأسبوع الثاني من التجريع وتشريح المجموعة الأولى حدد الاستعمار بواسطة اختبار اليوريز السريع إذا أعطت جميع الحيوانات المجموعة نتيجة إيجابية، بينما أمكن الحصول على البكتريا بواسطة الزرع من خزعة نسيجية واحدة.

أما التغييرات النسيجية فقد حددت في اثنين من الحيوانات المجرعة باللقاح البكتيري بعد مرور الأسابيع الأربعة أعطت المجموعة الأخيرة نتائج إيجابية للاختبارات الثلاثة مقارنة بحيوانات السيطرة التي لم تظهر أية حالة مرضية أو إيجابية لأي من الاختبارات.

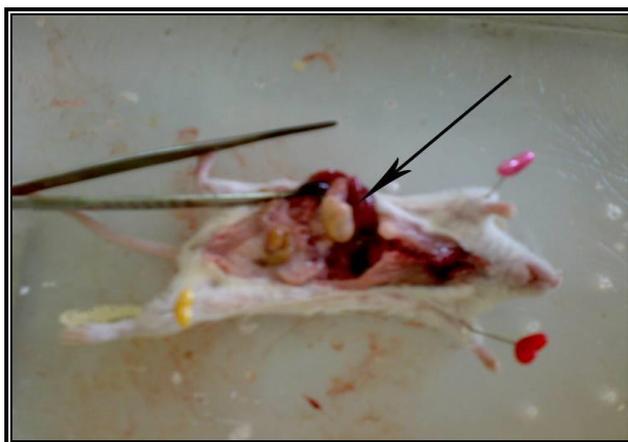
جدول (5): معدل الاستعمار البكتيري ونسبة تحديده في الاختبارات في الحيوانات المختبرية المجرعة

نسبة تحديد بكتريا <i>H. pylori</i>					الاختبار Assay
النسبة المئوية	الكلي	المجموعة الثالثة	المجموعة الثانية	المجموعة الأولى	

100%	9:9	3:3	3:3	3:3	+VE/ Total	اختبار البوريز السريع
78%	9:7	3:3	3:3	3:1	+VE/Total	الزرع البكتيري

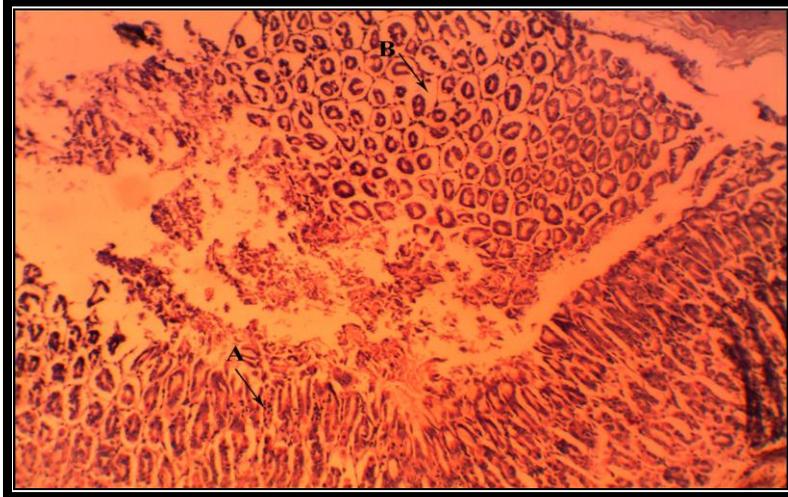
دراسة التغيرات النسيجية المرضية لمعدة الحيوانات المجرعة ببكتريا *H. pylori*

بعد تقسيم الحيوانات المجرعة(الفأران) إلى ثلاث مجاميع منفصلة، تم تشريح المجموعة الأولى بعد مرور أسبوعين من إعطاء اللقاح الجرثومي. بعدها فحصت الأحشاء الداخلية للحيوانات بالعين المجردة، حيث لوحظ وجود تضخم ملحوظ بشكل كبير وزيادة في حجم المعدة مقارنة بحيوان السيطرة الذي أظهر حجم المعدة الطبيعي، (شكل6)

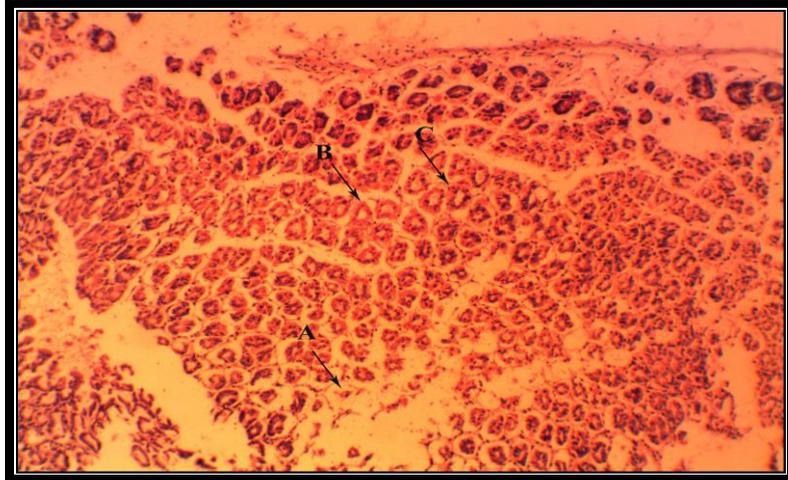


شكل (2): الانتفاخ الحاصل في معدة الحيوان المجرع

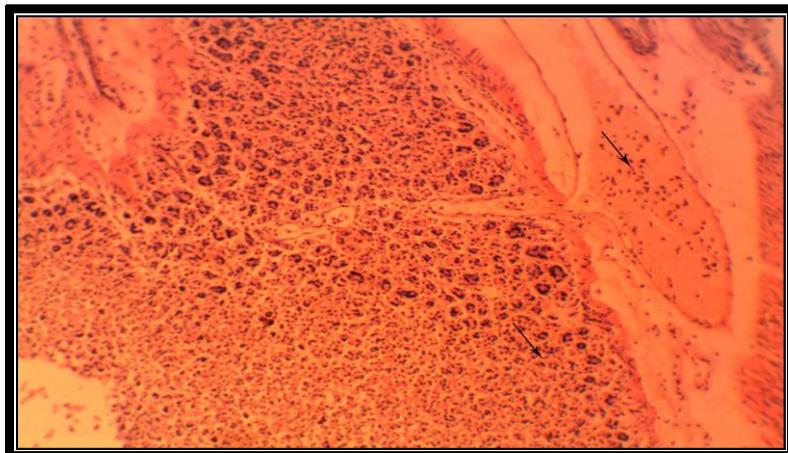
أظهرت نتائج الدراسة النسيجية المرضية لحيوانات المجموعة الأولى من الفئران المخموجة (بعد مرور أسبوعين من إعطاء الجرعة الجرثومية) في طبقة المخاطية للمعدة Mucosa ظهور تفاعل التهابي Inflammation مصحوب بأرتشاح عدد قليل من الخلايا الالتهابية المتمثلة بخلايا العدلات POLYMORPH NUCLEAR cells (PMNs) والخلايا اللمفية Lymphocytes CELLS في الصفيحة المخصوصة Lumina PROPRIA في الطبقة المخاطية مع ظهور حالة الانتكاس المائي Hydropic DEGENERATION الظاهر في الخلايا الظهارية للغدد المعدية المتمثل بانتفاخ SWELLING الخلايا الغدية المعدية نتيجة لتجمع قطرات الماء داخل سايتوبلازم الخلايا الطلانية للغدد المعدية Gastric GLAND وكذلك حدوث حالة احتقان في الأوعية الدموية في الطبقة تحت المخاطية. أظهرت نتائج المجموعة الثانية (بعد ثلاثة أسابيع من إعطاء الجرعة الجرثومية) نتائج متماثلة بظهور التهاب من الدرجة الأولى والمتضمن لارتشاح عدد من خلايا الدم البيض متعددة أشكال النواة (PMNS) في الصفيحة المخصوصة، فضلاً عن ارتشاح لعدد قليل من الخلايا اللمفية والحمضية Eosinophils CELLS والخلايا البلازمية Plasma CELLS، وحدث الانتكاس المائي الشديد في الغدد المعدية الذي أدى إلى انفجار بعضها ومن ثم اضمحلالها. كما أظهرت حيوانات المجموعة الثانية وجود نفحة التهابية Odematous المتمثلة بتجمع السوائل البلازمية داخل تجويف الغدد المعدية. كما بينت هذه المجموعة ظهور حالة التفجج Vaculation في عدد من الخلايا الطلانية المعدية للغدد المعدية في الطبقة المخاطية فضلاً عن حصول انسلخات شديدة Sloughing في الطبقة السطحية للجزء المخاطي نتيجة للاستعمار البكتيري. أظهرت نتائج المجموعة الثالثة (بعد مرور أربعة أسابيع من إعطاء الجرعة الجرثومية) التهاب من الدرجة الثالثة تمثل بأرتشاح كبير للخلايا الالتهابية، وزيادة الانسلخات بشكل كبير في الطبقة المخاطية، بداية حصول القرع Ulceration في الطبقة السطحية المخاطية، فضلاً عن التغيرات على مستوى أنويه الخلايا من زيادة في حجم الأنوية إلى اضمحلال في بعض الخلايا الطلانية للغدد المعدية. كما في الأشكال(11-3).



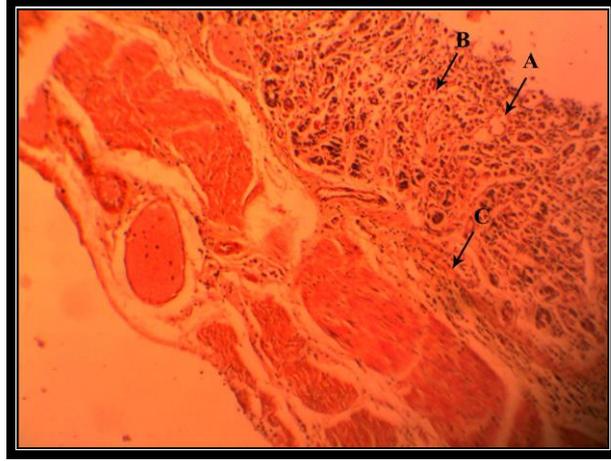
شكل (A-3): مقطع في غار معدة لأحد حيوانات المجموعة الأولى بعد مرور أسبوعين من التجريع
A= ارتشاح عدد من الخلايا الالتهابية، B= الانتكاس المائي في الغدد المعدية. صبغة (H&E) قوة تكبير (400x)



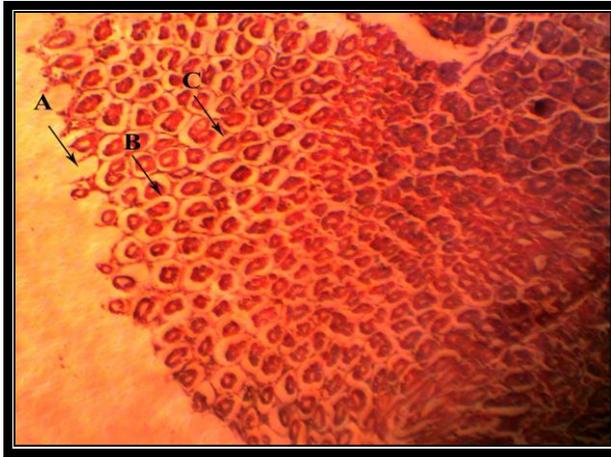
شكل (B-4): مقطع في غار معدة لأحد حيوانات المجموعة الأولى بعد مرور أسبوعين من التجريع =A الانتكاس المائي في الغدد المعدية في الطبقة المخاطية، B= احتقان الأوعية الدموية، C= ارتشاح عدد من الخلايا اللمفية صبغة (H&E) قوة تكبير (400x)



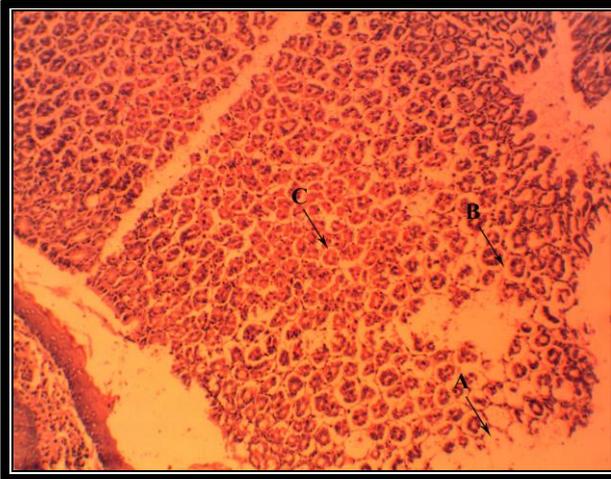
شكل (C-5): مقطع في غار معدة لأحد حيوانات المجموعة الأولى بعد مرور أسبوعين من التجريع
ارتشاح كبير للخلايا الالتهابية صبغة (H&E) قوة تكبير (400x)



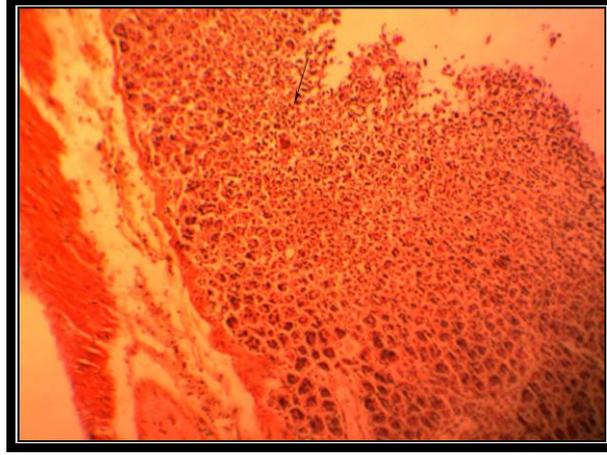
شكل (A-6):مقطع في غار معدة فار لأحد حيوانات المجموعة الثانية بعد مرور ثلاثة أسابيع من التجريع
A= نضحة النهائية Oedematous، B= احتقان الأوعية الدموية، C= ارتشاح عدد من الخلايا اللمفية صبغة (H&E) قوة تكبير (400x)



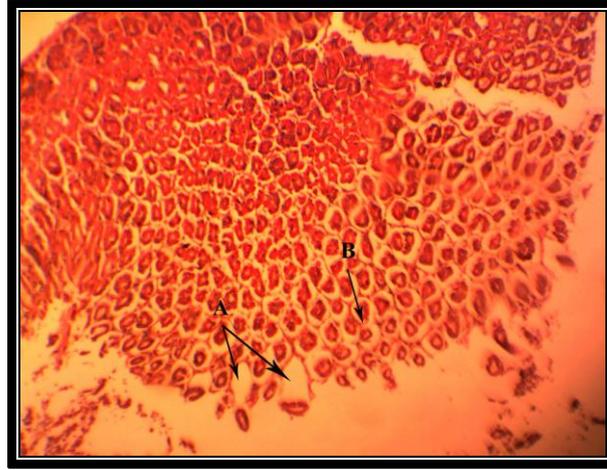
شكل (B-7):مقطع في غار معدة فار لأحد حيوانات المجموعة الثانية بعد مرور ثلاثة أسابيع من التجريع
A= انسلخات في الطبقة السطحية لمخاطية المعدة، B= انتكاس مائي للخلايا الظهارية المعدية، C= زيادة حجم النواة وظهور حالة التفجي صبغة (H&E) قوة تكبير (400x)



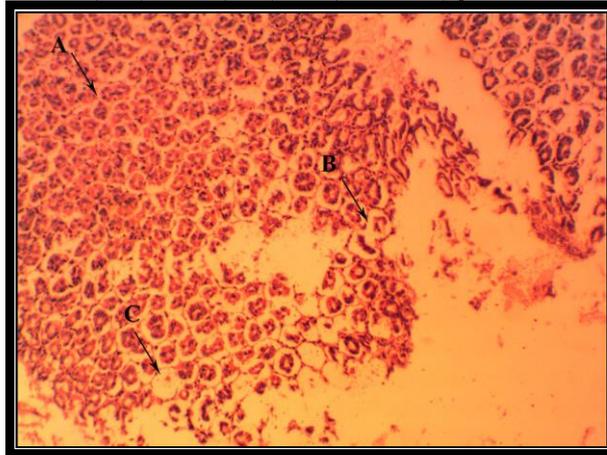
شكل (C-8):مقطع في غار معدة فار لأحد حيوانات المجموعة الثانية بعد مرور ثلاثة أسابيع من التجريع
A= انتكاس مائي مع بداية تقرح في الطبقة المخاطية، B= زيادة حجم الانوية وظهور التفجي، C= احتقان الأوعية الدموية صبغة (H&E) قوة تكبير (400x)



شكل (A-9):مقطع في غار معدة فار لأحد حيوانات المجموعة الثالثة بعد مرور أربعة أسابيع من التجريع يوضح حالة التدرج في ضمور خلايا المعدة وظهور عدد كبير من الخلايا الالتهابية صبغة (H&E) قوة تكبير (100x)



شكل (B-10):مقطع في غار معدة فار لأحد حيوانات المجموعة الثالثة بعد مرور أربعة أسابيع من التجريع =A بداية التقرح في الطبقة المخاطية مع الانسلاخات الشديدة،B= زيادة حجم النواة وظهور حالة التفجى (Vacuolation)،صبغة (H&E) قوة تكبير (400x)



شكل (C-11):مقطع في غار معدة فار لأحد حيوانات المجموعة الثالثة بعد مرور أربعة أسابيع من التجريع =A ظهور حالة الاحتقان للأوعية الدموية وارتشاح الخلايا الالتهابية،B= بداية حدوث التقرح والانسلاخات في الطبقة السطحية المخاطية،C= يظهر حالة التفجى والنضحة الالتهابية صبغة (H&E) قوة تكبير (400x)

المناقشة Discussion

تعدّ بكتريا *H. pylori* من الممرضات المهمة للإنسان إذ تستوطن معدة الإنسان مسببة له العديد من الأحماج فهي البكتريا المسببة لالتهاب المعدة المزمن وتشكل أيضاً عاملاً خطراً ومميزاً لنشوء القرحة الهضمية (3). كما ميزت بكتريا *H. pylori* بوصفها مسبباً رئيساً لأمراض القرحة الهضمية والمرتبطة بشكل رئيس مع سرطان المعدة (21) فقد ذكر (22) إن بكتريا *H. pylori* تسبب التهاب المعدة المزمن للمرضى المصابين بالبكتريا وجاءت هذه النتائج متفقة مع (23) من إن انتشار حالات التهاب المعدة المزمن للمرضى المصابين بهذه البكتريا. لقد كانت النتائج المتحققة من الإصابة ببكتريا *H. pylori* عند مرضى القرحة الهضمية متفقة مع نتائج عدد من الدراسات (24,25) إذ اشارت هذه الدراسات إلى إصابة (95%- 100%) من مرضى قرحة الاثنى عشر بهذه البكتريا و(70%- 85%) من مرضى قرحة المعدة يحملون هذه البكتريا.

هنالك بعض النظريات المقترحة حول دور البكتريا في أمراضية القرحة الهضمية من هذه النظريات تلك التي تشير إلى دور البكتريا في تحفيز إفرازية الحامض المعدي اختزال جريان الدم الواصل إلى الطبقة المخاطية في المعدة، تثبيط إفراز بيكاربونات المعدة، تثبيط إفراز المخاط المعدي، تثبيط إفراز البروستاغلاندينات وتحويل الخلايا الظهارية المعدية في حالة قرحة المعدة إلى خلايا ظهارية معوية وفي حالة قرحة الاثنى عشر تحويل خلايا العفج الظهارية إلى خلايا ظهارية معدية Gastricmetaplasia (26).

ومن الأسباب التي جعلت العديد من الباحثين تقنع بدور بكتريا *H. pylori* بالإصابة بالقرحة الهضمية هو وجود هذه البكتريا في معظم مرضى القرحة الهضمية، كما إن التجارب المختبرية التي أجريت على الحيوانات وعلى الناس المتطوعين أوضحت إصابتهم بالتهاب المعدة عند إصابتهم بهذه البكتريا وان معالجة البكتريا والقضاء عليها عند المرضى المصابين بالقرحة الهضمية يؤدي إلى سرعة شفائهم وتجنب ظهور المضاعفات لديهم (27)

أخضعت جميع العزلات المحلية لبكتريا *H. pylori* والمعزولة من الخزعات النسيجية المعدية للتشخيص الجزيئي بواسطة استخدام تقنية الـPCR إذ تعدّ هذه التقنية حديثة ومتطورة وواحدة من أكثر التقنيات دقة وحساسية في تشخيص بكتريا *H. pylori* والتي تعتمد على الحامض النووي الـDNA البكتيري (27). فالتضخيم بواسطة الـPCR يجعل من الممكن تحديد هوية البكتريا ولو بوجود كميات جدا دقيقة من DNA البكتريا *H. pylori* (26). اختيرت في هذه الدراسة المورث *UreaC gene* بوصفه جزيئه هدف باستعمال بادئات متخصصة لهذه الجريئة فالمورث *UreaC gene* يعدّ الأفضل والأكثر حساسية وتردد في بكتريا *H. pylori* مقارنة مع المورثات الأخرى كالمورث *Urea A*, *Urea B* المسؤولة عن انتاج وفعالية إنزيم اليوريز *Urease* لذلك اشتمت البادئات من هذه الجينات (المورثات). اظهرت نتائج الدراسة الحالية نسبة حساسية التشخيص لهذه التقنية (89%) النسبة جاءت مقارنة الى النسبة التي حصلت عليها دراسة أجريت في الصين والتي سجلت نسبة حساسية (91%) (28) كما فاقت هذه النسبة النسبة المسجلة عند دراسة أجريت في بولندا والتي سجلت نسبة حساسية (62%) في الكشف عن هذه البكتريا في الخزعات النسيجية المعدية باستخدام المورث *Urea A* بوصفه جزيئه هدف (29). إن الاختلافات في نسب التشخيص بتقانة الـPCR تعطل بعوامل عديدة فقد تفسر النسبة الواطنة بسبب الإمكانيات المتوافرة لديهم إذ تمكن العديد من الباحثين استخلاص الحامض النووي البكتيري مباشرة من الخزع النسيجية، في حين في هذه الدراسة زرعت البكتريا أولا من الخزعات ومن ثم أجريت عملية الاستخلاص للـDNA الكروموسومي. فالإدامة الحيوية للبكتريا في تكرار الزراعة والحفظ بالتجميد ينتج عنها تغيير في صفات البكتريا فضلا عن انقطاع التيار الكهربائي أسباب في إعطاء النتائج السالبة ففي الأبحاث العالمية تحفظ العينات بدرجة (-70) م لحين إجراء هذه التقانة وبذلك تبقى العزلات البكتيرية محافظة على صفاتها ولهذا تكون الحساسية والنوعية عالية حين تصل نسبة الحساسية إلى (100%) ونسب نوعيتها (94%) (30). علل (31) النسبة الواطنة للتشخيص بتقنية الـPCR إلى فقدان الحامض النووي الـDNA البكتيري خلال عملية الاستخلاص وهو السبب الرئيسي في حصول النتائج الواطنة كما عزي النتائج السالبة إلى البادئات التي لم ترتبط بشكل مناسب مع المورث الهدف،

أظهرت نتائج الدراسة النسيجية لحيوانات المجموعة الأولى من الفئران المجرعة التهابا مصحوبا بأرتشاح عدد قليل من الخلايا الالتهابية وظهور حالة الانتكاس المائي الظاهر في الخلايا الظهارية للغدد المعدية. وهذه النتيجة متفقة مع ما اشاروا اليه (32,33) إن الالتهاب المعدي يقسم إلى ثلاث درجات بواسطة الفحص المجهرى، فقد يكون من الدرجة الأولى عند وجود مجاميع صغيرة من الخلايا الالتهابية قريبة للطبقة المخاطية العضلية المخصوصة، ومن الدرجة الثانية عندما يكون عدد الخلايا في الارتشاح الالتهابي أكثر شدة وانتشارها خلال الطبقة المخاطية، ويعد الالتهاب من الدرجة الثالثة إذا كان شديد مع ارتشاح التهابي غزير متعدد منتشر خلال الطبقة المخاطية مع تكوين حويصلات لمفاوية، أن سبب ظهور الالتهاب من الدرجة الأولى في حيوانات المجموعة الأولى قد يعزى هو فقدان البكتريا لحجين الفوعة (*CagA*) لما يمتلكه من دور

أساسي في الأمراض لخصوصيته في بكتريا *H. pylori* فقط في المعدة البشرية، كما يعدّ هذا العامل الأكثر خطورة في أحداث قرحة الاثني عشر من حيث حدوث التفاعل الالتهابي وهذا يتفق مع ما وجدّه بعض الباحثين في المجال نفسه الذين لاحظوا أيضاً الالتهاب يكون أبطأ في الفئران منه في الإنسان (34). أما نتائج المجموعة الثانية فقد جاءت متوافقة مع نتائج (33,35) وربما يعزى السبب في ذلك إلى أن التفاعل الالتهابي يزداد في الفئران المصابة بسلاسل بكتريا *H. pylori* ($CagA^+$ & $VacA^+$) في الأسبوع الثالث للحقن، مما يؤدي إلى حدوث حالة التفجفي في عدد من الخلايا الطلانية المعدية وحصول الأنسلاخات في الطبقة السطحية للجزء المخاطي نتيجة الاستعمار البكتيري.

كما فسر (36) وجود أعداد كبيرة من الخلايا الالتهابية في الطبقة المخاطية المعدية بهجرة هذه الخلايا إلى المنطقة المتضررة نتيجة تحرير النسيج الظهاري المتضرر للسايوتوكاين التي تعمل على جذب هذه الخلايا إلى المنطقة المتضررة وأن شدة وجود هذه الخلايا تتناسب مع مقدار الضرر المتكون ومع زيادة عوامل جذب هذه الخلايا (Chemotaxis). وكانت هذه التغيرات النسيجية في الحيوانات المصابة بالبكتريا *H. pylori* أكثر شدة مقارنة مع حيوانات السيطرة.

كما جاءت نتائج المجموعة الثالثة متوافقة مع (37) ويعزى السبب في ذلك إلى حدوث تغيرات على مستوى الأنوية، فضلاً عن زيادة الأنسلاخات وحدث الضمور الغدي، وحدث بداية تفرح في الطبقة السطحية المخاطية سببها الالتهاب الخلوي المكون للفجوات أو عوامل الضراوة الأخرى لبكتريا *H. pylori*، كما فسر (38) الضمور الغدي في غدد خلايا الظهارية متأثراً من عوز هرموني مثل هرمون الكاسترين مما يؤدي إلى اختلال في الاتزان الهرموني والذي بدوره يؤدي إلى الضمور. كما إن التخدشات السطحية في النسيج المبطن لغار المعدة ناتجة من تأثير بكتريا *H. pylori* فقد أشار (39) إلى أن هذه البكتريا شأنها شأن بقية أنواع البكتريا السالبة لصبغة غرام يحتوي غشاؤها الخلوي على سكريات دهنية متعددة الـ LPS وهذه السكريات الدهنية تساعد على إفراز السايوتوكاين وكذلك تتصف بالسمية وتتفاعل مع النسيج الظهاري مسببة ضرره والمتمثل بالالتهاب.

المصادر

- 1 Parsonnet,R.; Hansen, S.; Rodriguez, L.; Gelb, A.B.; Warnk, R.A.; Jellum, E.; Oretreich, N.; Vogelman, J.H.; Friedman, G.D. (1994). *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. N. Engl. J.Med.330:1267-1271.
- 2 Dunn, B.; Cohen, H, and Blaser, M.J.(1997). *Helicobacter pylori* Clin. Microbial. Rev.;10(4):720-41.
- 3 Letelly, J.; James, R.B.; Darren, P.L and John C.A.(2003). *Helicobacter pylori* Supernatants Cause epithelial cytoskeleton distraction that is bacterial strain and epithelial cell line dependant but not toxin VacA dependent. Infect. Immunity, J.P: 3623-3627 Vol. 71, No.6.
- 4 Costanzo, S.L.(1998). Physiology.1th.edn.W.B. Sanders company. P.290-333.
- 5 . Culter, A.F.; S. Havtad, C.K.; Ma, M.J. Blaser; G.I. Perez-Perez, and T.T. Schubert.(1995). Accuracy of invasive and non invasive tests to diagnose *Helicobacter pylori*. Infect. Gastroenterol.109:136-1.
- 6 Xu, G.M.J.; XH.; Li.; Zs.; Zhang H.F.; etal.(1999). Clinical significance of PCR in *Helicobacter pylori* DNA detection in human gastric disorder. China Nati .J. new Gastroenterol,3 (2):89-100.
- 7 Souto, F.J.D.; Fontes, C.J.F.; Rocha, A.G.; Olieria, A.M.R.; Mandes, E.N.(1998). Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in aural area of hte state of Motocross. Brazil. Men. Inst. Oswald Cruz.93:171-174.
- 8 Kersulyte, D.; Mukhopadhy, A.K.; Velapation, B.; Su, W.; Penz, Z, and Garcia, C.(2000). Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. J. Bacteriol.;82: 3210-3218.
- 9 Kato, S, and Sherman, PM.(2005). What is new related to *Helicobacter pylori* infection in children and Teenagers Arch .Pediator .Adolse. Med.159:415-421.
- 10 Fyderek, K.; Przybyszewska, K.; BieLanski, W.(2006). Frequency of *Helicobacter pylori* infection in children under 4years of age .J. Phylosphy and Pharmacology.57, (supp3): 133-122.

- 11 Song, G.; Haller, B.; urich, D.; Adler, G.; Bode, G.(2000). Quantitation of *Helicobacter pylori* by PCR .J. Clin. Patho.53: 218-222.
12. Cesar, ACB.; Cury, PM.; Payao, SLM.; Liberatore, PR.; Silva, AE.(2005).Comparison of histological and molecular diagnosis of *Helicobacter pylori* in benign lesions and gastric adeno carcinoma. Brazilian .J. Microbial.36:12-16.
- 13 Parsonnat, J.; Welch, K.; Compton, C.; Stranss, R.; Timothy, W.; Kelsey, P, and Ferraro, M.J.(1988). Simple microbiological detection of *Campylobacter pylori*, J. Clin. Microbiol.;26(5):948-949.
- 14 Holloway, Y.; Schiphnis, J.; Weites, L, and Snider, J.A.M. (1994). Luxuriant growth of *Helicobacter pylori* and *Campylobacter* species in candal Jar after primary isolation. Eur. J. Clin. Microbial. infect. Dis.13;831-32.
- 15 Holt, J.G.; Kriegen, N.R.; Staley, J.T.; and Williams, S.T.(1994). Group2 aerobic /microaerophilic motile Helical/ Vibroid gram negative bacteria In: Berge's manual of determination Bacteriology, PP.42-48 19th edition Williams& Wilkins, USA.
- 16 Marshall, B.J, and Goodwine, C.S.(1987). Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. Int. J. Syst. bacterial.37:68 Cited by: bukely, M.J. M, and O'morain, C.A(1998). Helicobacter biology-discovery, Brit. Med. Bull.54(1):7-16.
- 17 Sambrook, J.; Fritsch, E.F, and Maniatis, T.(1989). Molecular cloning: a laboratory manual (2th end) Gold Spring Harbor. New York. USA.
- 18 Marshall, B.J, and Goodwine, C.S.(1987). Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. Int. J. Syst. bacterial.37:68 Cited by: bukely, M.J. M, and O'morain, C.A(1998). Helicobacter biology-discovery, Brit. Med. Bull.54(1):7-16.
- 19 Sambrook, J.; Fritsch, E.F, and Maniatis, T.(1989). Molecular cloning: a laboratory manual (2th end) Gold Spring Harbor. New York. USA.
- 20 Elizabeth, M.A.; Rabelo-Goncalves, Nancy, F.; Nishimura and Jose murib, R.; Zeitune.(2005). Development of a BALb/C mouse model of *Helicobacter pylori* infection with fresh and frozen Bacteria. Biol .Res.38:101-109.
- 21 Luna, L.G.(1978). Manual of histological staining methods of the armed force institute of pathology.3th ed .McGraw-Hill book, Co. London.
- 22 Marshall, B.J & Warren, J. R.(1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1(8390):1311-1315.
- 23 السكر، رباب قاسم محمد.2007.دراسة مرضية وجزيئية لبكتريا *Helicobacter Pylori* المعزولة من المرضى المصابين بالقرحة المعدية والمعوية. أطروحة دكتوراه- كلية العلوم/ جامعة بغداد.
- 24 Elizabeth, M.A.; Rabelo-Goncalves, Nancy, F.; Nishimura and Jose murib, R.; Zeitune.(2005). Development of a BALb/C mouse model of *Helicobacter pylori* infection with fresh and frozen Bacteria. Biol .Res.38:101-109.
- 25 Sprung, D.J.; Apter. M.N.(1998). What is the role of the *Helicobacter pylori* in peptic ulcer and gastric cancer outside the big cities. J. Clin, Gastroenterology.26(1):60-63.
- 26 Anthony, J.;D.; S.B. Benjamin, and H, Hawes.(1997). Peptic ulcer disease. Gastrointestinal.11(1):285.
- 27 Lerang, F.M.; B. Oum.; T.B. Hang, and P. Tolas.(1997). Highly effective twice day triple therapies for *Helicobacter pylori* infection and peptic where disease dose in vitro metronidazole resistance have any clinical relevance .A.J. Gastroent 92(2)248-252.

- 28 Xu, G.M.J.; XH.; Li.; Zs.; Zhang H.F.; *etal.*(1999). Clinical significance of PCR in *Helicobacter pylori* DNA detection in human gastric disorder. China Nati .J. new Gastroenterol,3 (2):89-100.
- 29.Dzieranowaska, D.; A. Gzyl, E. Rozynek, D. Celinskacedro, W. Dura, and D.E. Berg.(1999). PCR- based diagnosis of *Helicobacter pylori* in infection in Polish children and adults. Journal of Medical Microbiology, Vol 48, 4329-356.
- 30 Vandamm, P, and Deley, J.(1991). Proposal for a new family *Helicobactericeae*, int. J.Bacteriol. 41:451-5.cited by: owen. R.J.(1998). *Helicobacter* species, classification and identification, Brit. Med. Bull.54(1):17-30
- 31 **Dzieranowaska, D.; A. Gzyl, E. Rozynek, D. Celinskacedro, W. Dura, and D.E. Berg.**(1999). PCR-based diagnosis of *Helicobacter pylori* in infection in Polish children and adults. Journal of Medical Microbiology, Vol 48, 4329-356.
- 32 Marchetti, M.; Arico, B.; Burrioni, D.; Fingura.; N.; Rappuoli, R, and Ghiara, P.(1995). Development of mouse model of *Helicobacter pylori* infection. That micmes humen disease, scien.:267:1655-1658.
- 33 Sturegard, E.; Sjunnesson, H.; Willen, R.; ALeljune, P.; Ho, B.; wadstron, T.(1998). Severe gastric in *Helicobacter pylori* infected guinea pigs. Gut,(5):41 suppl 1:A118.
- 34 Cover, T.L.; Blaser, M.J.(1992). Purification and characterization of the vaculating toxin from *Helicobacter pylori* .J. Biolchem. 267:10570-10575.
- 35 Wang, X.; Sturegrad, E.; Rupart, R.; Nillson, H.O.; Aleljung, P.A.; Garlen, B.; Willen, R, and wadstrom, T.(1997). Infection of BALb/C amice by spiral and coccoid of *Helicobacter pylori* .J. Med. Microbial.;46:657-663
- 36 Sipponen, P.(1996). Chronic gastric and ulcer risk. Scand .J. Gastroenterology.25:193.
- 37 Christoph, B.; Pius, H.; Meyer-wyss, B.M, and Mossis .(2000). Risk among gastroenterologists of acquiring *Helicobacter pylori* infection: Case- control study Gut; 321:149.
- 38 Costanzo, S.L.(1998). Physiology.1th.edn.W.B. Sanders company. P.290-333.
- 39 Goupte, S.(1995). Short textbook of medical microbiology. Taypee brothers. medical Publishers Ltd. India P289-291.

A Study of *Helicobacter pylori* pathogenesis in laboratory mouse

*Dr.Maitham Ghaly Yousif, Ph.D., Jamal Kadhim M.Sc.

*Department of Biology, College of Science, Al-Qadysia University

Abstract

Helicobacter pylori is considered one of the most etiology of active chronic gastritis, peptic ulcer, ulcer and inflammation of the duodenum, gastric cancer, and tumors associated with the mucous layer.

Gastric biopsies were collected from(80)a condition subject to examination endoscopy (42 males and 38 females) with differenced ages, in Deywanya Teaching Hospital for the period 25/10/2009 until 09/03/2010 diagnosed 77 (96%) condition. The biopsies were taken from each patient from the mucous layer of the gastric antrum to investigate the bacteria *H. pylori* used one to check urease rapid and the other to isolate the bacteria into the center of DENT'S selective medium, which is the best center in the first isolation compared to other media.

The study showed the efficiency of test urease rapid screening for bacteria, as it was able to prove the presence of bacteria in 43 (54%) biopsy tissue, while the isolation of bacteria from 18 (23%) condition mediated transplant bacterial and under conditions of low ventilation, isolates genetically has been typing using specialized primers to the detect gene that represents the gene UreaC and equal (820) base pairs was spectrum using technology which is the most quality and sensitivity is a technology interaction polymerase serial (PCR) Polymerase Chain Reaction, where the local strains which secrete urease were grown, then genetic material isolated and purified DNA was from it to use in the investigation of gene UreaC responsible for the secretion of urease. The identification was made by direct bacterial *H. pylori* from the saliva of patients where it was purification and extraction of genetic material the DNA of the bacteria without the development and use of primers, specialized gene target Urea C and after amplification of this gene identified in four cases only satisfactory.

The Histopathological studies of *H. pylori* in laboratory animals (mice) BALb / C mice showed the emergence of changes in tissue degenerative severe included the appearance of infiltration of cells, inflammatory, including cells multiple nuclei (Polymorph nuclear cells) (PMNs), (Lymphocyte cells) and (Plasma cells) in the lamina propria layer mucosa and the gastric glands, as demonstrated by degeneration of water in the epithelial cells of the layer of mucus and gastric glands to the point of increasing the volume of glands Hypertrophy with a erosion in the surface layer of the part of the mucosa and a case of congestion of the blood vessels with a case of vaculation in a number of epithelial cells infectious diseases, as well as the third group show the state of cellular degeneration and the onset of ulceration in the stomach mucosa, compared with the control group that did not show any tissue change.