جمهورية العراق

وزارة التعليم العاليّ والبحث العلميّ

جامعة ديالى

كليّة العلوم

دراسةٌ بكتريولوجيةٌ ووراثيةٌ على بكتريا ***Helicobacter pylori*** المعزولة من الالتهاباتِ المعديةِ للإنسان

رسالة

مقدمة إلى مجلس كليّة العلوم – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

عليّ غازي حمدي

بأشراف

م.د. مثنى عبدالقادر المهداوي

صفر 1438هـ تشرين الثاني 2016 م

﴿ يُؤْتِي الْحِكْمَةَ مَن يَشَاءُ وَمَن يُؤْتَ الْحِكْمَةَ فَقَدْ أُوتِيَ خَيْرًا كَثِيرًا وَمَا يَذَّكَّرُ إِلَّا أُولُو الْأَلْبَابِ ﴾

آية 269/ سورة البقرة

الإهداء

إلى حَفَظَةِ سرِّ اللهِ مَهْبِطَ وحيهِ

الرسول الكريم محمد ﴿صلى الله عليه ووسلم﴾

إلى الشفاه التي أكثرت الدعاء لي كلما نطقت . . . والدتي الغالية . . . براً وإحسانا

إلى أبي وأخواني وأخواتي . . . . محبةً ووفاء

إلى سندي وعوني . . . . علاء محمد حميد

إلى كل من علمني حرفاً ومهّد لي للعلم طريقاً . . . . أساتذتي الأفاضل

أهدي ثمرة جهدي المتواضع

علي

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف المرسلين سيدنا محمد وعلى آله الطيبين الطاهرين وصحبه أجمعين . وبعد ...

يطيب لي وأنا أنهي رسالتي هذه أن أوجه أسمى آيات الشكر والاعتزاز لأستاذي الفاضل الدكتور **مثنى عبدالقادر المهداوي** الذي كان أباً قبل أن يكون مشرفاً متمنياً له دوام الصحة والعافية، لاقتراحه موضوع البحث ومشاركته في تكبد المشاق لتوفير مستلزمات البحث، وإرشاداته القيمة، التي كان لها الأثر الكبير في إنجاز البحث وفقه الله وجزاه عني خير الجزاء.

وأقدّم الشكر والامتنان الجزيلَيْن إلى السيد عميد كلية العلوم الأستاذ المساعد الدكتور **تحسين حسين مبارك** والى رئاسة قسم علوم الحياة مُمَثلاً بأساتذته وطلبته، واحيي روح التعاون العالية التي أبداها الطبيب المختص في الجراحة العامة الدكتور **أحمد علوان القيسي** وكافة منتسبي وحدة الناظور في مستشفى بعقوبة التعليمي فلهم جزيل الشكر والإحترام، وأقدّم شكري الجزيل وامتناني إلى الأستاذ الدكتور **خالد جمال حمدي** الذي مدَّ لي يد العون وساندني بكلمات التشجيع والدعم المعنوي خلال مدة البحث. وفقه الله لما يحبه ويرضاه.

وأخيراً وأقدّم حبي وتقديري إلى أفراد عائلتي الكريمة الذين تحملوا معي الكثير من أجل أنجاز هذا البحث وأقبل يدي والدتي عرفاناً وامتنانا.

ومن الله العون والتوفيق

علي

الخلاصة:

هدفت الدراسة إلى التحري عن البكتريا الحلزونية *Helicobacter pylori* في المرضى المصابين بأمراض المعدة والأمعاء (Gastrointestinal diseases)، بواسطة اختبار اليوريز السريع ، الاستنبات البكتيري ، الاختبار المصلي عن طريق الأجسام المضادة IgG والكشف عن الجين التشخيصي (16S rDNA) وبعض جينات الضراوة (*ureA, cagA, vacA*) لهذه البكتريا بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR).

جمعت العينات (خزعات نسيجية ودم) من 40 حالة من المحالين إلى وحدة الناظور في مستشفى بعقوبة التعليمي في محافظة ديالى للفترة من تشرين الأول 2015 إلى شباط 2016، حيث بين فحص الناظور التشخيصي هيمنة التهاب المعدة المزمن وبنسبة 40%(12) من الحالات تليها قرحة الإثني عشر بنسبة 23.34%(7) في حين ظهرت قرحة المعدة بنسبة 16.67%(5) ، أما مرض ارتجاع المعدة المريء GERD فكانت نسبته 13.33%(4) وشكلت حالات سرطان المعدة نسبة 6.67%(2) وبالمقابل كان هناك 10 حالات لم تظهر لديهم أي من أمراض المعدة والأمعاء واعتبروا كمجموعة سيطرة. شخصت البكتريا بأربعة فحوصات مختلفة شملت اختبار اليوريز السريع للخزعة النسيجية (Rapid urease test for biopsy) ، اختبار التحري عن الأجسام المضاد لهذه البكتريا في المصل نوع IgG (Rapid anti *H. pylori* test) ، اختبار الاستنبات البكتيري Bacterial culture والتشخيص بواسطة الجين (16S rDNA) الخاص ببكتريا *Helicobacter pylori* في الخزعة النسيجية ، وتم الكشف بعض جينات الضراوة لهذه البكتريا والتي تشمل (*ureA, cagA* and *vacA*) بوسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR.

اظهر اختبار اليوريز السريع وجود بكتريا *Helicobacter pylori* في 43.33% (13) من الخزعات، في حين بين اختبار التحري عن الأجسام المضاد لهذه البكتريا في المصل نوع (IgG) تواجدها بنسبة56.67% (17) بينما كانت نسبة عزل البكتيريا 10%(3) وأعلى نسبة لتشخيص هذه البكتريا كانت عن طريق الكشف عنها بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR باستخدام الجين (16S rDNA) حيث سجل 80%(24). وبين الكشف الجزيئي عن الجينات الضراوة *ureA, cagA* and) *vacA*) لهذه البكتريا أن 91.66%(22) من المرضى المصابين ببكتريا *H. pylori* من خلال الكشف عنها بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR يمتلكون الجين *ureA* وهو من اهم الجينات المسئولة عن ضراوة هذه البكتريا والذي يشترك في إنتاج انزيم اليوريز في حين وجد الجين *cagA* المشفر للبروتين المرتبط مع السمية الخلوية بنسبة 66.66%(16) وكانت نسبة الكشف عن الجين *vacA* المشفر للبروتين الذي يسبب تحوصل الخلايا 45.83%(11) أما نسبة التداخل بين

الجينات الثلاثة وجدت في 12.5%(3) من مجموعة المرضى وكان تأثيرها واضح في حالات قرحة المعدة وقرحة الاثني عشر.

بينت النتائج أن أفضل طريقة للتحري عن بكتريا *Helicobacter pylori* الكشف عنها بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR بعد استخلاص الدنا DNA مباشرة من الخزعات وأن الجين *cagA* محدد بنسب عالية جدا في حالة سرطان المعدة بعكس الجين *vacA*.

المحتويات

التسلسل	الموضوع	الصفحة
	قائمة المحتويات	I
	قائمة الجداول	VII
	قائمة الأشكال و المخططات	IX
	قائمة المختصرات	X
الفصل الأول: المقدّمة		
1.1	المقدّمة	1
2.1	الهدف من الدراسة	2
الفصل الثاني استعراض المراجع		
1.2	لمحة تاريخية عن بكتريا المعدة الحلزونية	3
2.2	الصفات العامة للبكتريا الحلزونية	4
3.2	الوبائية	5
4.2	العلامات والأعرض	5
5.2	طرق انتقال الإصابة	6
1.5.2	الإنتقال البرازي الفموي	6
2.5.2	الإنتقال الفموي الفموي	6
3.5.2	الإتصال بين شخص وآخر	7
4.5.2	الإنتقال عن طريق الماء	7
6.2	امراضية البكتريا الحلزونية	7
7.2	الامراض التي تسببها البكتريا الحلزونية	9
1.7.2	التهاب المعدة المزمن	9
2.7.2	القرحة المعدة	9

3.7.2	القرحة الاثني عشر	10
4.7.2	سرطان المعدة	10
5.7.2	السرطان اللمفي المرتبط بالأنسجة	11
8.2	البكتريا الحلزونية والامراض خارج المعدة	12
1.8.2	الاضطرابات الانجابية	12
2.8.2	مرض السكري	12
3.8.2	البكتريا الحلزونية ونقص الدون	12
4.8.2	البكتريا الحلزونية وامراض القلب الوعائية	12
5.8.2	العلاقة بين الاصابة بالبكتريا الحلزونية و مرض هاشيموتس للغدة الدرقية	12
9.2	تشخيص البكتريا الحلزونية	13
1.9.2	الفحوصات المصلية	14
2.9.2	فحص التنفس بعد اخذ اليوريا	14
3.9.2	اختبار المستضد البرازي	15
4.9.2	فحص اليوريز للخزعة النسيجية	15
5.9.2	الفحص النسيجي	15
6.9.2	الاستنبات	16
7.9.2	تشخيص بكتريا *H.pylori* بواسطة PCR من خلال الجين 16S *rDNA*	16
1.7.9.2	الجين 16S *rDNA*	16
2.7.9.2	التشخيص بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR	17
10.2	عوامل الضراوة للبكتريا الحلزونية	18
1.10.2	الجين المرتبط مع سمية الخلية	19
2.10.2	الذيفان الخلوي المكون للفجوات	20
3.10.2	الاسواط	20

4.10.2	بروتينات الغشاء الخارجي	20
5.10.2	السكريات المتعددة الدهنية	21
6.10.2	إنزيم اليوريز	21
7.10.2	إنتاج عدد من الإنزيمات الخارجية	21
11.2	وراثة البكتريا الحلزونية	22
12.2	التنظيم الوراثي للبكتريا الحلزونية	24
13.2	اليات مقاومة البكتريا الحلزونية للمضادات الحيوية	26
الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل		
3	المواد وطرائق العمل	27
1.3	المواد	27
1.1.3	الاجهزة	27
2.1.3	المستلزمات	28
3.1.3	الاوساط الزرعية	28
4.1.3	العدة التشخيصية	29
5.1.3	الصبغات	29
6.1.3	البوادئ	29
7.1.3	المواد الكيميائية	30
8.1.3	الكواشف و المحاليل	30
1.8.1.3	كاشف انزيم الاوكسيديز	30
2.8.1.3	كاشف انزيم الكاتليز	30
3.8.1.3	محلول سكرو	31
4.8.1.3	محلول TBE بقوة10X	31
5.8.1.3	صبغة بروميد الأثيديم	31

6.8.1.3	دم بشري	31
7.8.1.3	المحلول الفسيولوجي	31
2.3	الاوساط الزرعية	31
1.2.3	وسط سكرو	31
2.2.3	اوساط اغار الدم	32
3.2.3	وسط نقيع القلب والدماغ	32
3.3	طرائق التعقيم	32
1.3.3	التعقيم بواسطة الحرارة	32
2.3.3	التعقيم بواسطة الترشيح	32
4.3	طرائق العمل	33
1.4.3	جمع العينات	33
.2.4.3	زرع العينات	34
3..4.3	اختبار انزيم اليوريز السريع	34
4.4.3	تشخيص البكتريا	34
1.4.4.3	ملون غرام	35
2.4.4.3	اختبار انزيم الاوكسيديز	35
3.4.4.3	اختبار انزيم الكاتليز	35
4.4.4.3	اختبار انزيم اليوريز	35
5.4.3	اختبار للتحري عن الأجسام المضادة IgG لبكتريا *H. pylori*	37
5.3	التشخيص بتقنية الـ PCR	37
1.5.3	استخلاص الدنا الجينوم من النسيج	37
2.5.3	تقدير تركيز الدنا ونقاوتة	39
3.5.3	تشخيص وكشف عوامل ضراوة البكتريا بواسطة جهاز الدوار الحراري	39
1.3.5.3	تحضير البادئات	39

2.3.5.3	تحضير وسط تفاعل البلمرة المتسلسل	40
4.5.3	الكشف عن ناتج تفاعل الـ PCR وتقدير الأحجام الجزيئية لدنا	42
5.5.3	طريقة تحضير هلام الاكاروز	42
6.3	التحليل الاحصائي	43
الفصل الرابع: النتائج والمناقشة		
4	النتائج والمناقشة	44
1.4	للحالات المرضية المشخصة بواسطة الناظور	44
2.4	توزيع مجموعتي الدراسة حسب الجنس	45
3.4	الفئات العمرية لمجموعتي الدراسة	46
4.4	الاختبارات التشخيصية	47
1.4.4	اختبار اليوريز السريع للخزعة النسيجية	47
2.4.4	التحري عن الاجسام المضادة الخاصة بالبكتريا الحلزونية	49
3.4.4	اختبار الزراعة البكتيرية	50
4.4.4	الكشف عن بكتريا *H.pylori* في الخزعة النسيجية عن طريق الجين (16SrRNA) بوسطة تفاعل البلمرة المتسلسل	52
5.4	تأثير العلاجات على كفاءة تشخيص بكتريا *H.pylori* و تحديد نسبة انتشارها في مجموعة المرضى	55
1.5.4	المقارنة بين نتائج اختبارات الزرع البكتيري و تفاعل البلمرة المتسلسل PCR بالنسبة لمجموعة المرضى مع أو بدون أخذ العلاجات السابقة	55
2.5.4	نسبة انتشار بكتريا *H. pylori* في مجموعة المرضى	56
6.4	تحديد جينات ضراوة البكتريا الحلزونية بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسلPCR	58
7.4	الكشف عن جينات الضراوة لبكتريا *H.pylori* في الحالات المرضية المختلفة	61
	الاستنتاجات والتوصيات	65
الفصل الخامس المصادر		
1.5	المصادر العربية	66

2.5	المصادر الأجنبية	67

الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1-2	الحساسية والخصوصية لطرق التشخيص المستخدمة للكشف عن بكتريا *H.pylori*	14
1-3	الأجهزة المستخدمة في هذه الدراسة المبين ونوعها ومنشأها	27
2-3	المستلزمات المختبرية المستخدمة في الدراسة الحالية والمبين نوعها ومنشأها	28
3-3	الأوساط الزرعية	28
4-3	العدد التشخيصية	29
5-3	الصبغات	29
6-3	البوادئ	29
7-3	المواد الكيميائية	30
8-3	مكونات وسط التفاعل المستخدمة لتضاعف الدناDNA	40
9-3	برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل المستخدم لتضخيم الجين (16S rDNA)	41
10-3	برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل المستخدم لتضخيم الجين (*ure*A)	41
11-3	برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل المستخدم لتضخيم الجين (*cag*A)	41
12-3	برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل المستخدم لتضخيم الجين (*vac*A)	41
1-4	الحالات المرضية المشخصة بالناظور	44
2-4	توزيع مجموعتي الدراسة وحسب النسب المئوية بالنسبة للجنس	45
3-4	الفئات العمرية والنسب المئوية لمجموعتي الدراسة.	46
4-4	اختبار اليوريز السريع للخزعة النسيجية بين مجموعتي الدراسة	48
5-4	التحري عن الأجسام المضادة الخاصة بالبكتريا الحلزونية	50
6-4	نتائج اختبار الزراعة البكتيرية للخزعة النسيجية بين مجموعتي الدراسة	51

7-4	قياس تركيز ونقاوة الدنا المستخلص من الخزع النسيجية باستخدام مطياف القطرة النانوية	52
8-4	نسبة موجبيه الكشف عن الجين (16S rDNA) لمجموعتي الدراسة	53
9-4	تـأثير أخـذ العلاجـات علـى كفـاءة التشـخيص باسـتخدام الاسـتنبات البكتيـري و تفاعل البلمرة المتسلسل PCR	55
10-4	الاختبارات التشخيصية المستخدمة للكشف عن بكتريا *H. pylori*	56
11-4	نسبة الكشف بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR عن جينات ضراوة	58
12-4	الكشف عن جينات الضراوة لبكتريا*H.pylori* في الحالات المرضية المختلفة	62

الاشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
1-2	التأثيرات الخلوية للذيفان الخلوي CagA في خلايا المعدة الظهارية.	19
2-2	المجين الكامل لبكتريا *H.pylori*	24
1-4	النتائج الموجبة والسالبة لاختبار اليوريز السريع في وسط اليوريا السائل.	49
2-4	الكشف عن ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR. للجين 16S rDNA	53
3-4	الكشف عن ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR للجين *ureA*	59
4-4	الكشف عن ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR. للجين *cagA*	59
5-4	الكشف عن ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR للجين *vacA*	60

المخططات

رقم المخطط	العنوان	الصفحة
1-2	مراحل حدوث سرطان المعدة بوساطة بكتريا *H.Pylori*	11
1-3	عزل وتشخيص وحفظ بكتريا *H.pylori*	36

المختصرات

المختصر	الكلمات
Ab	Antibody
Ag	Antigen
BabA	Blood group antigen binding Adhesion
CagA	Cytotoxin associated gene activity
EDTA	Ethyle Dimethyl Tetra Acitc acid
FBP	Ferrous sulfate-sodium metaBisulfite-sodium Pyruvate
G.I	Gastrointestinal
GERD	Gastro esophagus reflex disease
HOP	Helicobacter Outer membrane Protein
IL	Interlukin
LPS	Lipoplysaccharide
MALT	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
OMP	Outer Membrane Protein
P.P.I	Proton Pump Inhibitor
P.U	Peptic Ulcer
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potential hydrogen
rRNA	ribosomal Ribonucleic acid
S	Svedberg
SabA	Silated antigen binding Adhesion
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TNF	Tumor Necrosis Factor
UBT	Urea Breath Test
VacA	Vacuolating cytotoxin activity
WHO	World Health Organization

الفصل الأول المقدمة

1-1 المقدّمة

تُعد البكتريا الحلزونية *Helicobacter pylori* أليفة لكميات الهواء القليل (Microaero-philic) ، سالبة لصبغة غرام ، حلزونية الشكل (Symk وآخرون ، 2014) ، تمتاز بظاهرة تعدد الأشكال ، إذ قد تظهر بالشكل المكور والعصوي (Coccoid and Bacillary Forms) وتعد المسبب الرئيسي لحدوث تقرحات (Ulceration) المعدة و الأثني عشر و أصبحت هذه الأمراض شائعة في الآونة الأخيرة نظرا لانتشار هذا النوع من البكتريا والتي تكون ذات قدرة إمراضية شديدة إذ تصيب اكثر من نصف سكان العالم (Nevine وأخرون ، 2015 ؛ Mamoun وأخرون ، 2015). وأن حدوث الإصابة بهذه البكتريا يعود إلى جينات الضراوة التي تحملها أنماط وراثية خاصة من هذه البكتريا ومن أهم جينات الضراوة المرافقة لأمراض المعدة والامعاء هما *cagA* و *vacA* (Salimzadeh وآخرون ، 2015 ؛ Wang وآخرون ، 2015).

لتفادي الظروف القاسية الموجودة في تجويف المعدة (Gastric lumen) طورت هذه البكتريا آلية مقاومة حامض المعدة القاتل للميكروب (Microbicidal acid) ؛ وذلك من خلال الاستعمار في مكان ضيق جدا من غار المعدة وافراز إنزيم اليوريز الذي يحلل اليوريا الموجودة في الوسط إلى امونيا والتي تكون ذات التأثير الدارئ للحموضة حولها في بطانة المعدة وهو ما يمكنها من البقاء في معدة الأنسان مدى الحياة اذا لم يتم علاجها بمضادات الحياة (Bakir وآخرون ، 2012)، وبذلك تسبب العديد من الأمراض منها إلتهاب المعدة المزمن (Chronic gastritis) ، تقرح المعدة والأثني عشر (Gastric and duodenal ulcers) ، سرطان المعدة (Gastric cancer) ، و سرطان الأنسجة اللمفاوية المصاحبة للطبقة المخاطية Mucosa-associated lymphoid-tissue lymphoma) Erzooki و Manhal ، 2016).

أجرى العديد من الباحثين دراسات في العراق على هذه البكتريا، تضمنت استنبات هذه البكتريا من الخزعة النسيجية المأخوذة من المعدة أو تحديد الأجسام المضادة المتولدة ضدها في مصل الدم (البلداوي ، 2007). وكذلك أُجريت دراسة في العراق على (120) مريضا مصابا بأمراض المعدة والأمعاء ووجد لدى (100) مريض منهم جينات مختلفة لبكتريا (*H.pylori*) مثل (16S *rDNA*, *ureC* , *flaA* , *cagA*) إذ بين أن لهذه البكتريا دور في حدوث أمراض المعدة والأمعاء (السلمي ، 2010).

تُستخدم العديد من الطرق للكشف عن بكتريا *H.pylori* و تُقسم بالاعتماد على استخدام أو عدم استخدام جهاز الناظور (Endoscopy). وتشمل الفحوص التي تتطلب وجود خزعة نسيجية (Biopsy) كل من تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) ، الاستنبات البكتيري (Bacterial culture) ،

اختبار اليوريز السريع للخزعة النسيجية (RUT)، و الفحوصات النسيجية (Histological tests)، إذ تجرى جميع هذه الاختبارات على الخزعة النسيجة المستأصلة بواسطة الناظور وتسمى بالفحوص الاجتياحية (Invasive procedures). أما الاختبارات التي تتم بدون استخدام الناظور وتشمل اختبار المستضد البرازي (stool antigen tests) ، الاختبارات المصلية (serological tests) واختبار تنفس اليوريا (Urea breath test) حيث تعتبر هذه الاختبارات غير اجتياحية (Non-invasive procedures) (Behnam واخرون ، 2015).

تتصف بكتريا *H.pylori* بكونها شرهة (Fastidious) ، تظهر بكثافة قليلة في الأنسجة ممّا يؤدي إلى صعوبة تنميتها وتعتبر من الأحياء المجهرية بطيئة؛ لذلك يقترح تشخيصها من النماذج السريرية بصورة مباشرة باستخدام التقنيات الجزيئية (Molecular techniques) ، مثل تفاعل البلمرة المتسلسل PCR الذي يكون فريدا من نوعه في الحساسية والخصوصية العاليتين في التشخيص، والدقة في تحديد كل من وجود الإصابة والنمط الوراثي لهذه البكتريا (Abu-Sbeih وآخرون ، 2014). كما أن هذه التقنية الحديثة مكنت من الكشف عن الحمض النووي لبكتيريا *H.pylori* الموجودة في عينات الخزعات النسيجية المستأصلة من المرضى المصابين بأمراض المعدة والأمعاء (Espinoza وآخرون ، 2011).

2-1 الهدف من الدراسة Aim of study

نظرا لقلة الدراسات البكتريولوجية والوراثية في محافظة ديالى حول بكتريا *H.pylori* أُجريت هذه الدراسة بهدف:

1. عزل وتشخيص بكتريا *H.pylori* من المرضى المصابين بأمراض المعدة والأمعاء.
2. الكشف عن هذه البكتريا في الخزعة النسيجية بواسطة اختبار اليوريز السريع (Rapid urease test).
3. اختبار التحري عن هذه البكتريا في المصل الدم بواسطة الأجسام المضاد IgG.
4. استعمال تقنية الـ PCR للكشف عن هذه البكتريا من الخزعة النسيجية مباشرة.
5. الكشف عن جينات الضراوة (*ureA, cagA* and *vacA*) وتأثير ذلك في أمراضيتها.

الفصل الثاني استعراض المراجع

2-1 لمحة تاريخية عن بكتريا المعدة الحلزونية *H.pylori* Historical Review about

لقد تم اكتشاف بكتريا *H.Pylori* لأول مرة قبل مائتي عام من قبل الأطباء المختصين في علم الأوبئة وعلم الأمراض السريرية الذين كانوا يحاولون معرفه أسباب أمراض القرح الهضمية (Peptic ulcer disease) (Graham ، 1989). ففي عام 1875 لاحظ العلماء الألمان وجود بكتريا حلزونية في الغشاء المخاطي لمعدة الإنسان، لكن أُهملت هذهِ البكتريا لعدم مقدرتهم على تنميتها خارج جسم الكائن الحي (Blaser ، 2005) وفي عام 1892 تمكن عالم التشريح الإيطالي Giulio Bizzozero من وصف البكتريا الحلزونية التي تستوطن البيئة الحمضية القاسية في معده الكلاب. وفي عام 1899 لاحظ البروفسور Warley Jaworski وجود بكتريا حلزونية الشكل في راسب غسيل معدة الإنسان (Sediments of gastric wash) سُميت Vibrio rugula وأشار إلى دورها الأمراضي المحتمل في أمراض المعدة المختلفة ، ولاحظ العالم Salmonn في عام 1896 امكانية انتقال هذهِ البكتريا من الكلاب و القطط المصابة إلى الفئران. واعتمدت هذهِ الظاهرة في تطوير لقاحات ضد بكتريا *H.pylori* (Konturek ، 2003).

ولاحظ الكثير من الباحثين أثناء دراساتهم وجود أنزيم اليوريز في معدة الحيوانات آكلات اللحوم (Carnivorous) كالكلاب والقطط (Luck و Seth ، 2006). واتسعت هذه الملاحظات لتشمل معدة الإنسان إذ لوحظ وجود أنزيم اليوريز في معدة الإنسان وأعتقد آن ذاك بأنه يفرز من الخلايا الظهارية المعدية (Gastric epithelial cells) ، وتبين إن فعالية أنزيم اليوريز تختفي عند اخذ المضاد الحيوي التتراسايكلين (Tetracycline) (Lieber و Lefevre ، 1959). وتبين فيما بعد أن مصدر أنزيم اليوريز في المعدة يكون عن طريق ميكروبات خاصة وأُثبت ذلك من خلال غياب فعالية أنزيم اليوريز في معدة الحيوانات خالية الميكروبات (Microb–Free animal) (Delluva واخرون، 1968) . وأشار العالم Steer عام (1975) إلى العلاقة بين لإصابة ببكتريا *H.pylori* والتهاب المعدة (Gastritis). وفي عام 1979 أُعيد اكتشاف هذهِ البكتريا من قبل العالمين الاستراليين Barry Marshall و Robin warren المختصين في علم الأمراض النسيجية، إذ تمكن هذان العالمان من عزل هذا الكائن عام 1982 من العينات المخاطية لمعدة الإنسان (Mucosal Specimens from Human stomach). كما تمكنا من استنبات هذه البكتريا وبنجاح لأول مرة عام 1983 (Warren، 1983). واثبتوا أن معظم حالات حدوث قرحه المعدة (Stomach ulcer) والتهاب المعدة (Gastritis) تكون نتيجة استيطان المعدة ببكتريا *H.pylori* وهذا مخالف لما كان يعتقد سابقاً بأن هذه الأمراض تكون نتيجة تناول الأطعمة كثيرة التوابل (Spicy Food) أو الإجهاد (Stress) (Marshal و Warren ،1984).

وتشير الدراسات السابقة إلى عدم الاهتمام بهذه البكتريا ودورها في إحداث الكثير من أمراض المعدة والأمعاء (Gastrointestinal diseases) بما فيها سرطان المعدة، وذلك لبعض الاعتقادات التي كانت سائدة في ذلك الوقت بعدم إمكانية الكائنات المجهرية من البقاء في البيئة الحامضية للمعدة، لذلك جرت العديد من الدراسات لإثبات الدور المرضي لبكتريا *H.pylori* حينها قام العالم مارشال Marshall بتناول مزروع سائل من هذه البكتريا، وأُصيب بالتهاب المعدة ثم قام بعلاج نفسه وذلك باستخدام أملاح البزموث والمضادات الحيوية (Metronidazole, Bismuth Salt) (Marshall وآخرون ، 1998).

في عام 1997 نُشر تسلسل الجينوم الكامل لكروموسوم بكتريا *H.pylori* ومكنت هذه المعلومات من فهم المسالك الأيضية (Metabolic Path Way) بشكل كامل ، وكذلك تفسير النواحي البيولوجية لهذا الكائن (Ribeiro واخرون ، 2003)

وأخيرا حصل العالمان مارشال و وارن على جائزة نوبل للطب في عام 2005 لعملهما الباهر والمتواصل وتنميتهما بكتريا *H.pylori* خارج الجسم *in vitro* . (Wroblewski واخرون ، 2010).

2-2 الصفات العامة لبكتريا المعدة الحلزونية General Characteristics of *H.pylori*

تكون بكتريا *H.pylori* حلزونية الشكل (بشكل عصيات منحنية curved rod وليست ملتوية spirochete) ، سلبية لصبغة غرام، طولها من 2.5 – 4.0 مايكرومتر قطرها حوالي 5.0 – 1.0 مايكرومتر (Mandell واخرون، 2010). تكون أليفة لكميات الهواء القلية (Microaerophilic) أي أنها تحتاج إلى الأوكسجين ولكن بكميات قليلة أقل مّما يوجد في المحيط . تمتلك هذه البكتريا أنزيم الهيدروجينيز و تستخدمه للحصول على الطاقة عن طريق أكسدة الهيدروجين الجزيئي H_2 الناتج من البكتريا المعويّة (Intestinal Bacteria) (Olson وMaier ، 2002).

تتصف هذه البكتريا بصغر وتحدب مستعمراتها، وبأنها شفافة مشابهه لقطرة الماء وهي متحركة بفعل اسواط أحادية القطب مغمدة والتي تمكنها الحركة واختراق الأغشية المخاطية للمعدة، تمتاز بظاهرة تعدد الأشكال فقد تظهر على شكل جناح النورس وكذلك بالشكل العصوي وفي المزارع القديمة تظهر بالشكل المكور (Bode وآخرون ، 1993) ، تنمو هذه البكتريا في ظروف بيئية قليلة التهوية عند أس هيدروجيني pH 6-7 في وسط اغنائي مزود بالدم، اللهيمين أو والكركول. يعتبر وسط سكرو (Skirrow's medium) هو الوسط الانتقائي لبكتريا *H.pylori* لإحتوائه على معززات نمو (Growth supplement) تحفز نمو هذه البكتريا في الوسط وكذلك يحتوي هذا الوسط على خليط من المضادات الحيوية التي تثبط نمو الأنواع الأُخرى من الاحياء المجهرية. تكون بكتريا *H.pylori*

موجبة لاختبار اليوريز والكاتليز و الاوكسيديز (وهذه الخاصية تميزها عن الأنواع الأخرى التابعة لنفس الجنس) وتنمو عند 37مْ (Patrick و وآخرون ، 2005).

2- 3 الوبائية Epidemiogy

تُشير الدراسات الوبائية إلى أن اكثر من 50% من سكان العالم مصابين ببكتريا *H.pylori* (Peek واخرون، 2002 ؛ Karczewska واخرون، 2012) ولكن معدلات الإصابة بهذه البكتريا تكون متفاوتة بين البلدان. ففي البلدان النامية على سبيل المثال يكون معدل انتشار الأجسام المضادة البكتريا *H. pylori* يزيد عن 70 % (Nurgalieva وآخرون، 2002 ؛ Stasi و Provan ، 2008) .أما في البلدان المتقدمة تكون الإصابة ببكتريا *H.pylori* اقل شيوعا خصوصاً عند الأطفال الصغار وتزداد مع العمر لتصل إلى 50% عند سن البلوغ (Lane وآخرون، 2006 ؛ Zhou واخرون، 2012).

بينت بعض الدراسات أن نسبة الإصابة بهذه البكتريا تكون متساوية في كلا الجنسين، ولكن في دراسات أُخرى وجد أن نسبة الإصابة عند الذكور اكثر من الإناث (Mandell واخرون ، 2010). ويرتبط خطر الاصابة ببكتريا *H.pylori* مع الظروف المعيشية والوضع الاقتصادي والاجتماعي للأسرة (Sugimoto واخرون ، 2009).

2-4 العلامات والأعرض Signs and Symptom

هناك ما يزيد عن 80% من المصابين ببكتريا *H.pylori* لم تظهر عليهم أي اعراض مرضية (Boyanova ، 2011). وأن الإصابة الحادة قد تظهر كالتهاب معدي حاد (Acute gastritis) مع آلم بطني (Epigastric pain) أو غثيان (Nausea) حيث يتطور هذا الى التهاب المعدة المزمن (Chronic gastritis) وأن وجود بعض الأعراض الأُخرى غالبا ما يدلّ على عسر الهضم غير التقرحي (Non-ulcer dyspepsia) مثل الآم المعدة (Gastric pains) ، انتفاخ (Bloating) ، وأحياناً يحدث تقيء (Vomiting) أو براز أسود (Malena) (Ryan و Ray ، 2010).

وبينت الدراسات أن نسبة 10-20 % من الأشخاص المصابين ببكتريا *H.pylori* تتطور الإصابة لديهم الى القرحة الهضمية (Peptic ulcer) و 1-2% منهم يحدث لديهم سرطان المعدة (Kusters وآخرون ، 2006) . أن التهاب بوابة المعدة (Pyloric Antrum) غالبا ما يؤدي إلى قرحة الاثني عشر بينما التهاب جسم المعدة (Corpus) قد يؤدي إلى قرحة المعدة (Gastric Ulcer) و سرطان المعدة (Gastric Cancer) . لذلك من المكن أن يكون لهذه البكتريا دور في المرحلة الأولية التي تؤدي إلى التهاب في المعدة (Gastritis) ، وليس في المراحل الأُخرى المؤدية إلى حدوث السرطان

والتي تسمى (Carcinogenesis) (Brown ، 2000). ومن الممكن أن تترافق بكتريا *H.pylori* مع أمرض أخرى خارج المعدة (Extra gastric diseases) كما في أمراض القلب والأوعية الدموية (Cardiovascular diseases) ، مرض هاشيموتس للغدة الدرقية (Hashimoto's Thyroiditis)، نقص الدهون (Dyslipidemia)، مرض السكري (Diabetes Mellitus) والاضطرابات الإنجابية (Reproductive Disorders) (Jani و Günter ، 2010).

2-5 طرق انتقال الإصابة Transmission route of infection

إن انتشار الإصابة ببكتريا *H.pylori* يكون من خلال انتقالها بعدة طرق منها :-

2-5-1 الانتقال البرازيّ الفمويّ Fecal – Oral Transmission

عزلت بكتريا *H.pylori* من فضلات الأطفال المصابين بهذه البكتريا مّما يشير ذلك إلى إمكانية انتقالها من الخروج إلى الفم، وعزلت أيضا من فضلات البالغين ولكن بنسبة أقل إلا أن هناك بعض الصعوبة في عملية العزل بسبب التأثير السمي للبراز على هذه البكتريا أو أن الطرائق المستخدمة في العزل غير ملائمة(kuo ، 2014).

2-5-2 الانتقال الفموي – الفموي Oral – Oral Transmission

هناك بعض الدراسات استطاعت عزل بكتريا *H.pylori* من اللعاب أو من التجويف الفموي أو من صفائح الأسنان ، لكن الإصابة بهذه البكتريا غير شائعة بين المتخصصين بجراحة الأسنان وقد يحدث الإنتقال عن طريق الفم نتيجة تناول الطعام غير المطبوخ جيدا كما إن استعمال الملعقة نفسها خصوصا بين الأم وطفلها قد يؤدي إلى انتقال هذه البكتريا (Roch ، 2003) ، ولوحظ هذا في الدول الأفريقية وذلك عندما تقوم الأم المصابة بقطع الطعام بأسنانها ومضغه ثم تعطيه لطفلها الصغير فهي تساهم في أنتقال هذه البكتريا إلى الطفل، ويمكن أيضاً أن تنتقل البكتريا من المعدة إلى الفم عند الأطفال، إذ عزلت البكتريا من قيء طفل بعمر 6 سنوات وكذلك عزلت من اللعاب والعصير المعدي للإنسان مما يجعل التجويف الفموي طريق لانتقال البكتريا إلى مواقع أخرى نتيجة انحدارها من المعدة أثناء إرجاع المرئي (Rowland ، 2000) .

2-5-3 الاتصال بين شخص وآخر Person – Person Contact

يعتبر الاتصال بين شخص وآخر هو من أكثر طرائق الانتقال المحتملة الحدوث كما في الكادر الطبي لاسيّما بين العاملين على أجهزة الناظور أو المتخصصين بأمراض المعدة، وكذلك الاتصال بين الأخوة المصابين بالبكتريا وأفراد العائلة يساعد في حدوث الإصابة وزيادة خطر انتقالها وأن انعدام التوعية

الصحية بين الأفراد المصابين وتعاطي الكحول والتدخين قد تكون من أكثر عوامل الخطورة المحتملة لزيادة الإصابة ببكتريا *H.pylori* (Delport ،2007).

2-5-4 الانتقال عن طريق الماء Water Routs Transmission

تنتقل بكتريا *H.pylori* عن طريق الماء من خلال تلوث المصادر المجهزة للماء بالمواد البرازية والتي تكون مصدرا رئيسا لانتقال هذه البكتريا ولوحظ هذا بشكل واضح في البلدان النامية، إذ أن الماء يؤخذ مباشرة من الأنهار ومصادر المياه السطحية غير المعاملة، أو تكون المصادر المجهزة للماء غير معاملة بشكل صحيح أو كافٍ، اذ أن الولايات المتحدة شخصت هذه البكتريا في مياه المجاري، والمياه السطحية وكذلك المياه الجوفية باستخدام طرائق مختلفة (Meng وآخرون ، 2004). كما أُجريت ثلاث دراسات وبائية في أمريكا اعتمدت على أن انتقال هذه البكتريا يحدث عن طريق الماء أو الطعام الملوثين (Brown وآخرون ، 2002) وشُخصت هذه البكتريا من الماء أيضا باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) (السلمي ، 2010) وفي دراسات أُخرى وجد إن استهلاك الخضراوات غير المطبوخة والمسقية بمياه ملوثة أو مياه مجاري يزيد من احتمالية الإصابة إذ أن أكثر من 60 % من مجموع 1815 شخص والذين كانت أعمارهم أصغر من 35 سنة أعطوا نتيجة موجبة لإختبار *H.pylori* باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) (Farshad وآخرون ، 2003).

2-6 امراضية البكتريا الحلزونية Pathogenicity of *H.pylori*

لكي تتمكن بكتريا *H.pyori* من البقاء داخل المعدة فأنها يجب أن تقاوم الحموضة العالية لتجويف المعدة، وبذلك تستخدم اسواطها لإخترق الطبقة المخاطية والوصول إلى المكان الملائم والذي يكون بالقرب من طبقة الخلايا الظهارية للمعدة (Amini واخرون ، 2009) . تمتلك بكتريا *H.pyori* خاصية انجذاب كيميائي (Chemotaxis) تتحسس من خلالها بدرجة الحموضة (pH) داخل الطبقة المخاطية وتسبح بعيدا عن المحتوى الحامضي بإتجاه بيئة معتدلة في سطح الخلايا الظهارية. تتواجد بكتريا *H.pyori* على السطح الداخلي لخلايا المعدة الظهارية وأحيانا داخل هذه الخلايا (Mandell ، وآخرون 2010) ، وتنتج هذ البكتريا لاصقات (Adhesions) تساعدها بالالتصاق على الخلايا الظهارية في المعدة وبعد ذلك تنتج كميات كبيرة من إنزيم اليوريز الذي توجد جزيئاته داخل وخارج هذه البكتريا، يعمل اليوريز على تحطيم اليوريا(التي تكون منتشرة في مجرى الدم) إلى ثنائي أوكسيد الكاربون (CO_2) وامونيا (NH_3) . الأمونيا تتحول إلى أمونيوم (NH_4) عن طريق اكتساب بروتون (H^+) وبذلك تعادل حموضة المعدة. أن بقاء بكتريا *H.pyori* في المعدة يعتمد على أنزيم اليوريز. وأن الامونيا الناتجة من تحلل اليوريا بفعل انزيم اليوريز تكون سامة للخلايا الظهارية إلى جانب النواتج الاخرى لبكتريا *H.pyori*

التـي تكـون سـامة للخلايـا أيضـا والتـي تشـمل انـزيم البروتيـز، الـذيفان الخلـوي المكـون للفجـوات vacuolating cytotoxin A (VacA)، وبعض أنزيمات الدهون الفوسفاتية التي تحطم الخلايا وتكون مصحوبة بإمراضيه شديدة (Gillespie و Bamford ، 2012 ؛ Linz واخرون ، 2014).

أن استعمار المعدة ببكتريا *H.pyori* يولد التهاب المعدة (Gastritis) أما قرحة المعدة ولاثني عشر فتحدث عندما تكون هناك التهابات متعاقبة تسمح للحامض والببسين في المعدة من التغلب على الآليات التي تحمي مخاطية المعدة والأثني عشر من تأثير هذه المواد الضارة. إذ أن نوع القرحة الذي يحدث يعتمد على الموقع الذي يحدث به التهاب المعدة المزمن (Chronic gastritis)، والذي يكون في موقع تمركز بكتريا *H. pylori* (Longo واخرون، 2012 ؛ Axon ، 2007).

أن مستوى الحموضة بداخل تجويف المعدة يؤثر على نمط استعمار بكتريا *H. pylori* الذي يحدث وبالتالي يتحدد فيما اذا سوف تحدث قرحة معدة أو أثني عشر. تستعمر بكتريا *H. pylori* غار المعدة (Antrum) في الأشخاص الذين ينتجون كميات كبيرة من الحامض لتجنب الخلايا الجدارية المفرزة للحامض (Acid-secreting parietal cells) والتي تقع في جسم المعدة (Corpus) (Kusters واخرون ، 2006)، و أن الإستجابة الالتهابية لهذه البكتريا تحفز خلايا G في غار المعدة (Antrum) لإفراز هرمون الكاسترين والذي ينقل بواسطة مجرى الدم الى جسم المعدة. الكاسترين يحفز الخلايا الجدارية في المعدة لإفراز كميات كبيرة من الحامض الى تجويف المعدة . وبالتزامن مع زيادة مستوى الكاسترين تزداد كمية الحامض المفرز إذ أن هذه الزيادة تلحق الضرر بالأثنى عشر ويكون من الممكن حدوث قرحة الأثنى عشر. ومن ناحية أُخرى قد ترتبط قرحة المعدة بالإفراز الطبيعي أو المنخفض للحامض ، ويعود هذا إلى ضعف الميكانيكيات التي تحمي مخاطية المعدة من تأثير الحامض (Schubertو Peura ، 2008). وبذلك تتمكن بكتريا *H. pylori* في هؤلاء الأشخاص من استعمار جسم المعدة (Corpous) إذ تقع الخلايا الجدارية المفرزة للحامض. وتسبب الالتهابات المزمنة المحفزة بواسطة البكتريا وانخفاض انتاج الحامض وبالتالي ضمور بطانة المعدة (Stomach lining) ، والتي تؤدي بدورها الى حدوث قرحة المعدة وتزيد من فرصة حدوث سرطان المعدة (Suerbaum و Michetti، 2002).

2-7 الأمراض التي تسببها البكتريا الحلزونية *H.pylor* The diseases that caused by

2-7-1 التهاب المعدة Gastritis

تسبب الإصابة ببكتريا *H.pylor* التهاب المعدة الحاد والمزمن (Acute and Chronic gastritis) إذ يحدث الاتهاب الحاد نتيجة استعمار هذه البكتريا للطبقة المخاطية لتجويف المعدة وبذلك

تتجمع خلايا الدم البيضاء العدلة (Neutrophils) والخلايا متعددة الأشكال (Polymorpho nuclear cells) وينتج عنها استجابة التهابية حادة (Acute inflammatory response) وينخفض مستوى الحامض في المعدة (Hypochlorhydira) كنتيجة للإلتهاب الحادة.(Atherton ، 2006) في حال فشل هذه الاستجابة الأولية(الحادة) في التخلص من الإصابة تتجمع الخلايا المناعية الأُخرى والتي تشمل الخلايا التائية (T (cells، خلايا (B cells) والخلايا البلعمية (Macrophages) في مخاطية المعدة وتنتج التهاب المعدة المزمن (Chronic gastritis). (Polenghi وآخرون ، 2007)

2-7-2 قرحة المعدة Gastric Ulcer (GU)

تكون بكتريا *H.pylori* مصاحبة وبشدة لقرحة المعدة والتي تحدث المنطقة الانتقالية بين غار وجسم المعدةa Gillespie و Bamford ، 2012 ؛ Longo واخرون، 2012). توجد بكتريا *H.pylori* بنسبة 80% من المرضى المصابين بقرحة المعدة (Atherton ، 2006 ؛ Dixon ، 2001) أما في الأشخاص الذي يكون لديهم افراز الحامض بشكل مرتفع لا تتمكن بكتريا *H.pylori* من أن تستعمر(Colonize) في جسم المعدة (Corpus) بسبب دالة الحموضة المنخفضة (Low pH) ومع ذلك عند انخفاض مستوى افراز الحامض تنتشر هذه البكتريا خلال مخاطية المعدة (Gastric mucosa) (Mandell واخرون ، 2010). تحدث بكتريا *H.pylori* قرحة المعدة من خلال تجمع الخلايا الإلتهابية في مكان الإصابة والتي تحلق الضرر بطبقة الخلايا الظهارية للمعدة وهذ التغيرات تؤثر على إنتاج المخاط والبيكربونات و بالتالي تضعف الحاجز المخاطي (Mucus barrier) وتجعل الأنسجة حساسة جدا للتقرح (Araújo وآخرون ، 2014).

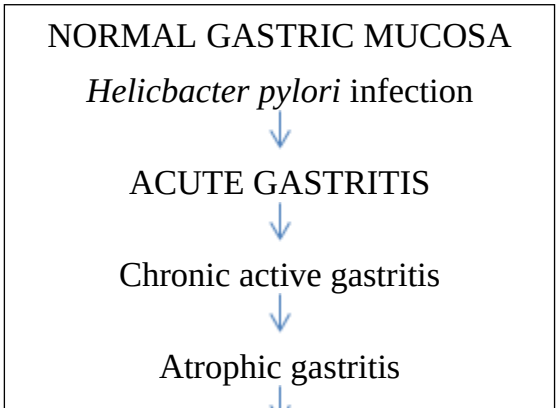
3-7-2 قرحة الأثنى عشر Duodenal Ulcer (DU)

تُعرف قرحة الأثنى عشر(Duodenal ulcer) بأنها التهاب مزمن أو حاد في طبقة الخلايا الظهارية للأثني عشر، وتعد بكتريا *H.pylori* بأنها مسبب رئيس لقرحة الأثنى عشر إذ تعمل على زيادة إفراز الحامض وهي الآلية المسؤولة عن تكوين القرح. توجد بكتريا *H.pylori* في 95% من المرضى المصابين بقرحة الأثني عشر(Prabhu و Shivani ، 2014) ، إذ تعمل هذه البكتريا على توليد التهاب مزمن في الطبقة المخاطية للمعدة وهذا بدوره يحفز الخلايا الجدارية (Parietal cell) على إفراز كميات كبيرة من الحامض و أن زيادة افراز الحامض إلى تجويف الاثني عشر تسمح بانتقال جزء من مخاطية المعدة (Gastric mucosa) على الأثني عشر وتسمى هذه العملية (Gastric metaplasia) وهي تغيرات أمراضية مسبقة تحول جزء من النسيج الى نسيج آخر (Axon ،2007).

وجود الخلايا الطلائية المعدية (Epithelial cell Gastric) في الاثني عشر تسمح بالاستعمار (Colonization) من قبل لبكتريا *H.pylori* والتي تعمل على توليد استجابة التهابية مزمنة (Chronic inflammatory response) (Atherton، 2006 ؛ Fikret واخرون ، 2001) . حدوث العملية الالتهابية والتأثير البكتيري على مخاطية الاثني عشر تجعله حساساً لحموضة المعدة (Gastric acidity) وبذلك تتولد قرحة الأثني عشر (Duodenal ulcer) (Araújo واخرون ، 2014). وكذلك تعمل بكتريا *H.pylori* على تقليل افراز السوماستاتين (Somatostatin) الذي يعد مثبطاً فعالاً للعديد من الوظائف الافرازية في القناة المعدية المعوية وبذلك يزداد مستوى الكاسترين الذي يسبب زيادة مستوى الحامض المفرز وبالتالي حدوث قرحة الأثني عشر (Baban وMohammed ، 2003).

2-7-4 سرطان المعدة stomach cancer

قدرت حوالي مليون حالة جديدة في عام 2008 من سرطان المعدة و يشكل 7.8٪ من عبء السرطان الكلي ويأتي في المرتبة الثانية لمسببات الوفيات الناشئة عن السرطان المؤشرة في جميع أنحاء العالم (738000حالة) لسنة 2008 (Ferlay و Bray ، 2010) ترتفع معدلات سرطان المعدة مرتفع بشكل خاص في آسيا وأمريكا اللاتينية، وبعض المناطق من أوروبا وأفريقيا. وعلى الرغم من المخاطر العالية للإصابة في بعض البلدان الآسيوية مثل اليابان وكوريا، والصين والدول الآسيوية الأخرى مثل الهند تؤثر معدلات منخفضة نسبيا من الإصابة بسرطان المعدة (Ferlay و shin ، 2010) وبينت الدراسات أن هنالك آليتين بواسطتهما تحفيز بكتريا *H. pylori* حدوث سرطان المعدة ولازالت قيد التحقيق. الآلية الاولى تتضمن حث انتاج الجذور الحرة (Free radical) ، إذ أنّ بروتينات بكتريا *H. pylori* تعزز من التصاق خلايا الدم العدلة (Neutrophil) إلى مخاطية المعدة والتي بدورها تنتج كميات كبيرة من أنواع الأوكسجين الفعال Reactive Oxygen Species(ROS) الذي يؤدي إلى تحطم الدنا DNA وإعادة تحويل الخلايا (Cell turnover) وبذلك تسهم في حدوث سرطان المعدة كما مبين في مخطط (2-1). الآلية المقترحة الأُخرى تدعى "Per genetic pathway"، إذ تعمل جزيئات الإشارة المرافقة للعمليات الالتهابية مثل عامل النخر الخلوي النوع ألفا (TNF-α) على أضعاف التحام خلايا المعدة الظهارية فيما بينها وبذلك يؤدي إلى انتشار خلايا ظهارية غير قادرة على الالتصاق دون الحاجة إلى حدوث طفرات في الجينات الكابتة للأورام (Tumor suppressor genes) التي تشفر بروتينات التصاق الخلية(Suganuma واخرون ، 2008).



المخطط(2-1): مراحل حدوث سرطان المعدة بوساطة بكتريا *H.Pylori* (Long وآخرون ، 2009)

2-7-5 السرطان اللمفي المرتبط بالأنسجة Mucosa–associated tissue lymphoma lymphoid

تحفز الإصابة ببكتريا *H.pylori* تجمع الخلايا اللمفاوية (Lymphoid cells) في الأنسجة تحت المخاطية لتصبح حويصلات لمفاوية وهذهِ الأخيرة تكون نسيجاً لمفاوياً، هذا النسيج اللمفاوي ضروري لنشوء سرطان المعدة اللمفي المرتبط بالأنسجة الخبيث (Malignant gastric MALT lymphoma). في دراسة أُجريت على 110 مريض مصاب بسرطان المعدة اللمفي المرتبط بالأنسجة وجدت *H.pylori* في 101 حالة أي بنسبة 92% (Wotherspoon واخرون ، 1991)

2-8 البكتريا الحلزونية وعلاقتها بالأمراض خارج المعدة

***Helicobacter pylori* Infection and Extra- Gastric Diseases**

2-8-1 الاضطرابات الانجابية Reproductive Disorders

بينت دراسات حديثة أن هناك علاقة بين الأصابة ببكتريا *H.pylori* و العقم (Infertility) (Duleba و Dokras ، 2012).

2-8-2 مرض السكري Diabetes Mellitus

تبين الدراسات الحديثة ارتفاع معدل انتشار الإصابة بالبكتيريا الحلزونية في المرضى الذين يعانون من مرض السكري (Diabetes Mellitus) (Gen و Ataseven ، 2010).

2-8-3 العلاقة بين البكتريا الحلزونية ونقص الدهون*H. pylori* and Dyslipidemia

الإصابة بالبكتريا الحلزونية قد تسبب نقص الدهون (Dyslipidemia) (Kucukazman وآخرون ، 2009).

2-8-4 البكتريا الحلزونية وأمراض القلب والأوعية الدموية H.pylori and Cardiovascular diseases

أثبتت العديد من الدراسات الحديثة أنّ هناك علاقة بين الإصابة بالبكتريا الحلزونية ومرض القلب التاجي Coronary heart disease (CHD) (Ayada وآخرون ، 2009 ؛ Al-Ghamdi وآخرون ، 2011).

2 -8- 5 العلاقة بين الاصابة بالبكتريا الحلزونية و مرض هاشيموتس للغدة الدرقية

The Association of *H. pylori* Infection with hashimoto's Thyroiditis

Hashimoto'sThyroiditis هو أحد أمراض المناعة الذاتية الناتجة من الاستعداد الوراثي (Genetic Predisposition) وارتباطه بعوامل البيئية الخارجة وتعتبر الإصابة ببكتريا *H.pylori* من العوامل الخارجية المحفزة لهذا المرض (Aghili وآخرون ، 2013).

2- 9 تشخيص البكتريا الحلزونية *H. pylori* diagnosis

تستوطن بكتيريا *H.pylori* سطح النسيج الطلائي المتجدد. والاستعمار بهذه البكتريا لا يعد مرضاً بل هو حالة ترتبط مع عدد من الاضطرابات في الجهاز الهضمي العلوي. وأن الكشف عن بكتيريا *H.pylori* يكون ضروري في أمراض القرحة الهضمية (Peptic ulcer disease) ، الورم اللمفاوي المرتبط بالأغشية الطلائية للمعدة (Gastric MALT lymphoma) وسرطان المعدة (Gastric cancer) (Kusters ،2006). وهناك العديد من الطرائق المستخدمة لتشخيص هذه البكتريا موضحة في جدول (2-1). بعض طرائق التشخيص المذكورة غير اجتياحيه (Noninvasive) مثل الكشف عن الجسم المضاد لهذه البكتريا في الدم (Blood anti body test) ، الكشف عن مستضد هذه البكتريا في البراز (Stool antigen test) و فحص التنفس بعد تناول اليوريا (Urea breath test) (Behnam وآخرون ، 2015).

فضلا عن ذلك هناك طرق أكثر دقة للكشف عن الإصابة بالبكتيريا الحلزونية هو اختبار الخزعة أثناء التنظير وأجراء اختبار اليوريز السريع و الفحص النسيجي والزراعة الميكروبية. وهناك أيضا اختبار الإدرار بواسطة ELISA مع حساسية 96٪ وخصوصية 79٪ . لاتوجد طريقة من طرق الاختبار المذكورة سابقاً تعطي ضماناً تاماً. وبما في ذلك الخزعة النسيجية إذ تعتمد على موقع الخزعة و بعض الأدوية يمكن أن تؤثر على فعالية اليوريز لبكتريا *H.pylori* وتعطي نتيجة سلبية كاذبة مع الفحوصات المعتمدة على اليوريا (Stenström وآخرون ، 2008).

جدول (2-1) الحساسية والخصوصية لطرق التشخيص المستخدمة للكشف عن بكتريا *H.pylori* (Cirak وآخرون ، 2007)

التسلسل	اسم الاختبار	الحساسية(%)	الخصوصية(%)
1	الاختبار المصلي (Serology)	80-95	80-95
2	اختبار تنفس اليوريا (UBT)	90-95	90-95
3	الزرع الميكروبي (Culture)	58.1	100
4	اختبار اليوريز السريع (Rapid urease test)	90	95
5	الاختبار النسيجي (Histology)	95	99
6	اختبار الانتجين البرازي (Stool antigen test)	96	97
7	تفاعل البلمرة التسلسلي (PCR)	98	99

2-9-1 الفحوصات المصلية Serological tests

تتضمن هذه الفحوصات الكشف عن الأجسام المضادة الخاص ببكتريا *H.pylori*. ومع ذلك تعتمد الدقة فيه على نوع الاختبار المصلي المستخدم . الاستخدام الرئيسي للفحوصات المصلية هو لاختبار مرضى عسر الهضم في المراحل الأولية ومرضى القرحة للكشف عن اضداد بكتريا *H.pylori* في سوائل الجسم ولكون الفحوصات المصلية تعطي نتيجة ايجابية لفترة طويلة حتى بعد الشفاء من الإصابة ببكتريا *H.pylori* لذلك لاتستخدم للتحقق من المعالجة الناجحة، لان الجسم المضاد في الدم يتناقص تدريجيا (Rahman وآخرون ، 2008 ؛ Lopes وآخرون ، 2014).

2-9-2 فحص التنفس بعد اخذ اليوريا Urea breath test

وهو من الإختبارات غير الإجتياحية المستخدمة للكشف عن بكتريا *H.pylori* ويعتمد على انزيم اليوريز المنتج من هذه البكتريا، تستخدم فيه اليوريا المعلمة بالكربون المشع C_{13} او C_{14} وتُعطى إلى المريض. في حال وجود بكتريا *H.pylori* في معدة المريض والتي تكون ذات قابلية عالية على انتاج انزيم اليوريز الذي يحلل اليوريا إلى أمونيا (NH_3) و ثنائي اوكسيد الكاربون (CO_2) وهذا الاخير يكون حاوي على الكربون المشع الذي يتم الكشف عنة خلال عملية الزفير. هذا الإختبار مفيد في التحقق من نجاح العلاج ، ويكون اكثر دقة من الاختبارات المصلية ، ويجب ان يتم بعد اسبوعين من التوقف عن أخذ العلاج المثبط لمضخة البروتونات Proton pump inhibitors (PPIs) وأربعة أسابيع بعد التوقف عن اخذ علاجات مركبات البزموث والمضادات الحيوية (Bismuth compounds or antibiotics). (Debabrata وآخرون ، 2007 ؛ Stenström وآخرون ، 2008).

2-9-3 اختبار المستضد البرازي Stool antigen test

وهو فحص اكتشف مؤخرا كبديل لفحص استنشاق اليوريا الذي يحتاج إلى متطلبات خاصة ويبدو أنّهُ بديلا مفيدا للكشف عن الإصابة النشطة، لكن لوحظ عليه أنّهُ أقلّ دقة لتقييم نجاح العلاج لكونه يكشف عن مستضدات هذه البكتريا ويعطي نتائج ايجابية في حال وجود هذه البكتريا في حالتها النشطة وغير النشطة (Active and non active form) (Malfertheiner وآخرون ، 2012).

2-9-4 فحص اليوريز للخزعة النسيجية Biopsy urease test

وهو من الإختبارات واسعة الإنتشار المعتمدة على الخزعة النسيجية المأخوذة من المعدة بواسطة المنظار. توضع الخزعة النسيجة في محلول اليوريا الحاوي على كاشف للحموضة (pH indicator) في حال وجود بكتريا *H.pylori* في الخزعة النسيجة تقوم بتحليل اليوريا بواسطة انزيم اليوريز وتنتج تغير لوني، بعض الاختبارات الإيجابية يمكن ان تحدث خلال ساعة ، وبالرغم من النتائج السلبية الأولية يجب أن تحفظ لمدة 24 ساعة لتجنب النتائج السلبية الكاذبة، إذ أن الدم الموجود في القناة المعوية العليا ربما في بعض الأحيان يعطي نتيجة ايجابية كاذبة (False positive) ويجب الإلتزام بفترة الانقطاع عن العلاج كما في اختبار استنشاق اليوريا (Debabrata وآخرون ، 2007 ؛ Lopes وآخرون ، 2014).

2-9-5 الفحص النسيجي Histology test

يمكن تشخيص الإصابة ببكتريا *H.pylori* بدقة عن طريق الفحص النسيجي للمرضى وذلك باستخدام صبغات خاصة ، إذ أن إنشار التهاب المعدة يمكن أن يعطي معلومات حول خطورة الإصابة بهذه البكتريا عندما تكون الخزعة النسيجية مأخوذة من غار أو جسم المعدة، وكذلك يتم الكشف عن التغيرات النسيجية التي تحدث والتي تؤدي إلى سرطان المعدة (Gastric adenocarcinoma) أو الضمور المعدي (Gastric atrophy) (Pourakbari وآخرون ، 2013).

2-9-6 الاستنبات Culture

عينات الخزعات النسيجية المأخوذة بواسطة الناظور يمكن أن تزرع على أوساط خاصة للكشف عن بكتريا *H.pylori* ويعتبر هذا الاختبار الأقل استخداماً بين الإختبارات التشخيصية الأُخرى وذلك بسبب أخذ العلاجات التي تثبط نمو هذه البكتريا وتعطي نتيجة سلبية للزرع ، ومع ذلك يعتبر من الاختبارات التشخيصية المهمة للكشف عن حساسية هذه البكتريا لمضادات حياة معينة وهذا الأمر مهم في توجيه مضادات محددة في حال فشل العلاجات السابقة (Di Rienzo وآخرون ، 2013). إن المرضى الذين يعانون من عسر الهضم يتم الكشف عن بكتريا *H.pylori* بواسطة الاختبارات المصلية ويبدو أنها اقتصادية و أن الكربون المعلم C_{13} في اختبار استنشاق اليوريا(يتطلب معدات مختبرية مكلفة والتعرض لإشعاع معتدل) يمكن أن يكون أكثر فعالية مقارنة بالاختبارات المصلية لكنة مكلف (Amini وآخرون ، 2009).

2-9-7 تشخيص بكتريا *H.pylori* بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR من خلال الكشف عن الجين 16S *rDNA*

2-9-7-1 الجين 16S *rDNA*

يعتبر الجين 16S *rDNA* من الجينات التي تسمى " Housekeeping" التي تكون موجودة في جميع الكائنات ويشفر لها في مختلف الظروف ، إذ تشترك نواتج هذه الجينات في الوظائف الخلوية الأساسية (Basic cellular function) كما هو الحال في الجين 16S *rDNA* الذي يشترك في تكوين الرايبوسوم والذي يكون في الكائنات بدائية النواة (Prokaryotes) بحجم 70s ويقسم إلى وحدتين ثانويتين 30s و50s ، يشفر الجين 16S *rDNA* إلى الرنا المراسل 16s rRNA الذي يشترك في تكوين الوحدة الثانوية 30S في رايبوسوم هذه الكائنات(Espinoza وآخرون ، 2011) .ويعتبر الكشف عن الجين (16S rDNA) من الطرق واسعة الاستخدام للكشف عن بكتريا *H.pylori* في النماذج السريرية المأخوذة من المرضى لقد استخدمت البادئات (Primers) للجين (16S rDNA) للكشف عن بكتريا *H.pylori* في العديد من البحوث. هذه البادئات (Primers) تعتبر كعلامات حيوية (Biomarker) لوجود بكتريا *H.pylori* . وهي احدى الأهداف الخاصة لتأكيد الإصابة بهذه البكتريا، وان عملية تضخيم (Amplification) قطع خاصة من الحامض النووي (DNA) الخاص ببكتريا *H.pylori* يمكن أن يُعتبر كدليل واضح لوجود هذه لبكتريا (Smith وآخرون ، 2004). وأن تضخيم قطع خاصة من هذا الجين تستخدم في تشخيص البكتريا بسبب وجود نسخ عديدة من (rRNA) مثل

5SrRNA ، 16 SrRNA و 23SrRNA ، لكل خلية بكتيرية والتي تزيد من نسخ الحامض النووي الهدف (DNA target) الآف المرات. لذلك تضخيم هذه الجين يمكن أن يعطي نتائج ايجابية في العديد من الحالات (Lim وآخرون ، 2003). أدى استعمال تتابعات 16S rDNA الى إعادة تصنيف العديد من الاجناس البكتيرية ونقل احياء جنس الى اخر وإستحداث اجناس وانواع جديدة اذ إستعمل الجين 16S rDNA في تشخيص بكتريا *H.pylori* الذي يميزها عن باقي انواع جنسها او الاجناس الاخرى ويعد هذا التشخيص ادق من الاختبارات التقليدية المستعملة مختبرياً, اذ ان الجين 16S rDNA يعطي تشخيصاً على مستوى النوع وله تتابع ثابت لكل نوع من الانواع البكتيرية لذلك له دور مهم جداً في التشخيص الجزيئي (Molecular Identification Hussien ، 2012).

2-9-7-2 التشخيص بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

تعرف تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) بأنها الطريقة التي يتضاعف بها تتابع معين من الحامض DNA أنزيماً ملايين المرات خارج الجسم وهذه التقنية تعد الأكثر شيوعاً في مختبرات الوراثة الجزيئية في العالم ، إذ تمتاز هذه الطريقة بخصوصيتها وحساسيتها العالية في التشخيص وأن الفائدة العظيمة لهذه التقنية هي قدرتها على تشخيص جينات هذه البكتريا دون الحاجة إلى استخدام الناظور(Abu-Almaali وآخرون ، 2012). إذ يكشف عن دنا بكتريا *H.pylori* في العصارة المعدية، ومن اللعاب والبراز للمرضى المصابين ، وأيضا يكشف بواسطتها عن البكتريا في الخزع النسيجية المعدية كذلك لهذه التقنية القدرة على التميز بين السلالات الضارية من السلالات قليلة الضراوة اعتمادا على امتلاكها مورثات خاصة لها علاقة بضراوة البكتريا , ولكن هناك أمور تؤثر في دقتها مثل اختيار البادئات المناسبة ، والدقة في اختيار الدنا الهدف ، والكثافة البكتيرية في عينة الدراسة (Moosavian وآخرون ، 2007). وأن تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) يمكن أن يشخص بكتريا *H.pylori* من النماذج السريرية بصورة مباشرة و الذي كان فريدا من نوعه في حساسية وخصوصية عالية في التشخيص، والدقة في تحديد كل من وجود الإصابة والنمط الوراثي لهذه البكتريا (Fyderek وآخرون ،2006). كما أن هذه التقنية الحديثة مكنت من للكشف عن الحمض النووي لبكتريا *H.pylori* من معدة ولعاب المرضى المصابين بها. وتعتبر واحدة من أكثر التقنيات المستخدمة في هذا المجال (Cesar وآخرون ، 2005) إذ توجد العديد من الجينات التي يمكن أن تكون هدف لهذه الطريقة وتستخدم لتشخيص بكتريا *H.pylori* مثل (16S *rDNA*) ، الجين الذي يشفر للوحدة الثانوية المكونة لأنزيم اليوريز(*uerA*) و الجين (*ureC*) *glmM* الذي يشفر فوسفو كلوكوز امين ميوتيز

(Phosphoglugoseamin mutase) (وهذا الجين ليس له علاقة بإنتاج اليوريز لذلك أُعيد تسميته إلى (*glmM*) والذي يعتبر من الجينات التي تسمى " Housekeeping" والتي تشترك بشكل مباشر في تصنيع الجدار الخلوي (Espinoza وآخرون ، 2011).

2-10 عوامل الضراوة Virulence factors

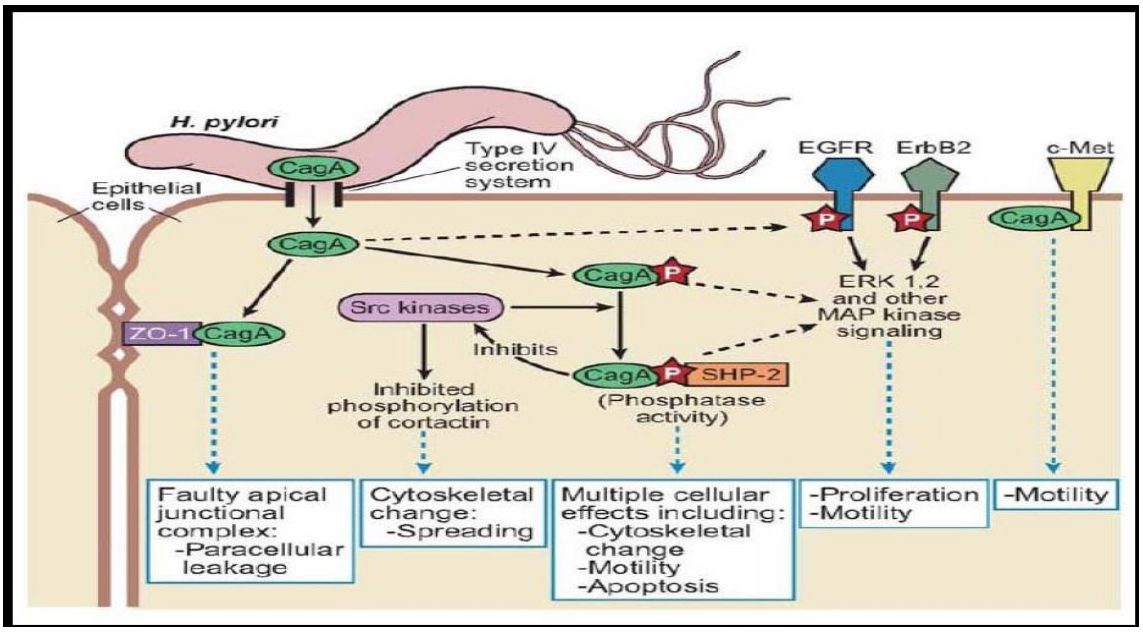
تعد بكتريا *H.pylori* ممرض مهم للإنسان، إذ أنها تُسبب العديد من الأمراض مثل: التهاب المعدة المزمن (Chronic gastritis) الذي يتطور إلى أمراض القرح الهضمية (Peptic ulcer) disease، السرطان اللمفي المرتبط بالأنسجة (Mucosa–associated lymphoid tissue lymphoma) و (سرطان المع (Gastric cancer). (Erzook و Manhal ، 2016).

وتشير الدراسات إلى أن بكتريا *H.pylori* تستعمر معدة ما يقارب نصف سكان العالم وتزداد نسبتها اكثر في البلدان النامية لتصل الى 70% (Karczewska وآخرون ، 2012 ؛ Mamoun وآخرون ، 2015). الشيء غير الواضح و المحير لماذا الأغلبية العظمى من الأشخاص المصابين ببكتريا *H.pylori* لا تظهر عليهم أعراض الإصابة (Asymptomatic) وفي المقابل نسبة قليلة من هؤلاء الأشخاص تظهر عليهم أعراض التهاب الأنسجة (Tissue Inflammation) الذي يتطور إلى قرحة القرحة الهضمية (Peptic ulcer) والورم اللمفاوي المعدي. أن حدوث الأمراض بسبب بكتريا *H.pylori* يعزى إلى عدم التوازن بين الآليات الدفاعية للعائل و عوامل الضراوة للبكتريا. إن سبب كون سلالات بكتريا *H.pylori* عالية الأمراضية و ذات قابلية على أحداث الأمراض يعود إلى جينات الضراوة الأساسية لهذه البكتريا والتي تشمل ألجين المرتبط مع سمية الخلية Cytotoxin associated gene A.(CagA) ، الذيفان الخلوي المكون للفجوات Vacuolizing Cytotoxin (VacA) و انزيم اليوريز Urease enzyme (Yamazaki وآخرون ، 2003).

1-10-2 البروتين المرتبط مع سمية الخلية Cytotoxin associated protein

وهو من أكثر عوامل الضراوة أهمية لبكتريا *H.pylori* ويشفر له بواسطة الجين (*cag A*). ولقد أكدت العديد من الدراسات أن الإصابة بالسلالات البكتيريا الموجبة للجين المرتبط مع سمية الخلية (*cag A*) تكون مرتبطة بالتهاب المعدة المزمن وارتفاع معدل انتشار القرحة الهضمية وسرطان المعدة في الدول الغربية، على عكس ذلك تكون العلاقة بين السلالات الموجبة الموجبة لهذا الجين والأمراض السريرية غير واضحة بشكل كامل في البلدان الأسيوية، لأن معظم سلالات بكتريا *H.pylori* تكون موجبة للجين

المرتبط مع سمية الخلية (*cag A*) (Wang وآخرون ، 2015). إن الجين المرتبط مع سمية الخلية يمثل مؤشرا للمنطقة الإمراضية Pathogenicity *cag A* Island (PAI) وهي مواقع في الحامض النووي (DNA) موجودة في معظم البكتريا السالبة لصبغة غرام مسؤولة عن النظام الإفرازي للخلية البكتيرية ، وقد وجد أن الجين (*cagA*) الذي أكتشف في بكتريا *H.pylori* عام 1990 يكون جزءا من المنطقة الإمراضية (PAI) لذا يسمى هذا الجين (*cag*APAI) ، إذ يشفر هذا الجين إلى إنتاج بروتين مستضد في مصول الأشخاص المصابين بسرطان المعدة المتسبب عن بكتريا *H.pylori* و يؤدي إلى تأثيرات خلوية متعددة كما موضح في الشكل (2-1).



شكل(2–1) التأثيرات الخلوية للذيفان الخلوي CagA في خلايا المعدة الظهارية .(Atherton, 2006)

2–10–2 الذيفان الخلوي المكون للفجوات Vacuolating cytotoxin A (VacA)

ينتج الذيفان الخلوي المكون للفجوات (VacA) من اغلب السلالات الممرضة، هذا البروتين يعد من عوامل الضراوة التي تسهم في إمراضيه القرح المعدية, إن الجين *vacA* يشفر لهذا البروتين تحت الظروف الطبيعية، إذ انه يتكون من جزئين مختلفين هما جزء طرفي أو نهائي يدعى (s-region) وله تتابعان هما s1 وs2 أما الجزء الثاني فهو الجزء الوسطي فيدعى (M-region) وله تتابعان ايضا هما m1وm2 , سلالات بكتريا *H.pylori* تمتلك اما الجزء الطرفي s1 او s2 الذيفان الخلوي. و تكون الضراوة عالية في السلالات الحاوية على تتابعات s1/m1 ثم يليها من حيث الضراوة السلالات الحاوية على التتابعات s1/m2 وتكون واقلها ضراوة هي السلالات الحاوية على تتابعات s2/m2. وكما هو في

حالة الجين *cag A* توجد هناك اختلافات جغرافية بين سلالات بكتريا *H.pylori* الحاوية على VacA والامراض التي تسببها ، ففي البلدان الغربية تكون الاصابة بسلالات البكتريا التي تمتلك VacAs1 شائعة جدا في المرضى الذين يعانون القرحة الهضمية اكثر مما فيه في التهاب المعدة المزمن أما في البلدان الأسيوية تكون العلاقة غير واضحة بين الامراضية السريرية وسلالات (*vacA*). ويعمل بروتين (VacA) على تكوين الفجوات بين الخلايا الطلائية المصابة مسببا تحرر محتوياتها وموتها (Bagheri، وآخرون ، 2013).

2-10-3 الاسواط Flagella

تمتلك بكتريا *H.pylori* (2-6) اسواط أحادي القطب (Unipolar) تكون سميكة ومغطاة لحمايتها من حموضة المعدة العالية وتمكنينها من اختراق الطبقة المخاطية لتجويف المعدة، يتكون خيط السوط من أثنين من بروتينات السوط وهناك حوالي 40 جين يشترك في تكوين وإفراز مواد السوط وتعمل انظمة الجذب الكيميائي (Chemotatic System) على توجيه السوط باتجاهات خاصة مثلا اتجاه مخاطية للمعدة واختراقها والوصول إلى الخلايا الطلائية في المعدة عندما تكون الحموضة عالية، كذلك فان شكل البكتريا الحلزوني مع حركتها التي تشبه فتاحة القناني (Cork Screw) تمكنها من مقاومة الحركة الموجية لمحتويات المعدة (Rust، 2008).

2-10-4 بروتينات الغشاء الخارجي Outer Membrane Protein(OMP)

في بكتريا *H.pylori* تكون بروتينات الغشاء الخارجي OMP ذات خصائص التصاقيه تمكنها من الاستيطان، البروتين الأول يسمى (BabA Adhesion) أما الثاني يسمى (Saba Adhesion) وهما من أهم بروتينات الغشاء الخارجي لأنها يلتصقان بالمستقبلات الموجودة على خلايا المضيف، إن وجود هذه البروتينات اللاصقة يُعتقد أنهُ يزيد من قابلية إمراضيه هذه البكتريا(Falaknazi وآخرون ، 2010).

2-10-5 السكريات المتعددة الدهنية Lipopolysaccharide(LPS)

يغطي LPS (هو من مكونات الغشاء الخارجي) سطح بكتريا *H.pylori* و يحتوي على لاصقات بكتيرية (Bacterial Adhesions) ، أن الخاصية في هذه اللاصقات في السلسلة الجانبية الكربوهيدراتية هي قدرتها على التعبير عن المستضدات التي يطلق عليها (Lewis b antigen) والمؤلفة من وحدات بوليميرية كربوهيدراتية مماثلة في تركيبها لمستضدات فصيلة الدم (O-antigen) التي يعبر عنها في جسم المضيف , وأن 80-90 % من سلالات بكتريا *H.pylori* لها القدرة على التعبير عن هذه المستضدات والتي تساعدا البكتريا في التهرب من الجهاز المناعي (Immune Bacterial Evasion) وقد تدخل ضمن عملية الالتصاق (Lundin واخرون ، 2004).

2-10-6 إنزيم اليوريز Urease Enzyme

تنتج بكتريا *H.pylori* أنزيم اليوريز الذي يعد من أهم عوامل الضراوة الخاصة بهذه البكتريا، إذ يمكنها من البقاء في بيئة المعدة التي تكون شديدة الحموضة ، إذ أنهُ يحمي البكتريا من حموضة المعدة عن طريق تولد ايونات الهيدروكسيل القاعدية OH^- وبالتالي تكوين الأمونيا التي تخفض حموضة المعدة، كما أن الأمونيا الناتجة تعتبر من المواد السامة والتي تسبب تحطم الأنسجة، وبالتالي تحرر النواتج الأيضية منها والتي تشجع النمو البكتيري .وكذلك فأن تحرر البروتونات الناتجة من تحلل اليوريا الموجودة في المعدة بشكل طبيعي إلى أمونيا(NH_3) وثاني أوكسيد الكاربون(CO_2) حيث يتحدان مع جزيئات الماء وبالتالي تنتج كربونات الأمونيوم الثنائية التي لها دور واضح في معادلة الحموضة وتوفير وسط قاعدي يحمي هذه البكتريا من حموضة المعدة وكذلك يولد قوة حركية (Proton Motive Force) تستخدمها البكتريا في توجيه السوط باتجاه معين وبالتالي البكتريا (Gillespie و Bamford ، 2012).

2-10-7 إنتاج عدد من الإنزيمات الخارجية Exoenzymes

هناك العديد من الأنزيمات الأُخرى التي تنتجها بكتريا *H.pylori* مثل الكاتاليز (Catalase)، البروتيز (Protease) ، اللايبيز (Lipase) ،الاوكسيديز (Oxidase) إذ أن هذه الأنزيمات يكون لها دور أساسي في تحفيز البكتريا على اختراق الطبقة المخاطية للمعدة , فضلا عن ذلك تنتج إنزيم الفسفوليبيز (Phospholipase) الذي يقوم بتفكيك طبقة الشحوم التي توجد في غشاء الطبقة الطلائية للمعدة (الظاهر،2001)

11.2 وراثة البكتريا الحلزونية *H.pylori* genetic

المادة الوراثية لهذهِ البكتريا هي كروموسوم مفرد دائري .(Single circular chromosome) يتراوح حجمهُ بين Mbp (1.6-1.73) ميكا قاعدة وهو بذلك مساوي لذلك الموجود في بكتريا *H.influenzae* ومقارب جداً لحجم كروموسوم بكتريا *C.jejuni* إذ يقدر بـ 1.7 Mbp(Chang و Taylor ، 1990)، وهذا الحجم صغير جداً بالقياس إلى ما موجود في معظم البكتريا المرضية ، فعلى سبيل المثال حجم جينوم (كروموسوم) سلالات بكتريا *Staphylococcus* يتراوح Mpb (3.1 -2.2) ميكا قاعدة (Prevost وآخرون ، 2002). وكذلك فان حجم جينوم بكتريا *Neisseria gonorrhoeae* هو Mbp 2.3 .أي أن حجم جينوم هذه البكتريا الصغير يكون مساوياً لثلث حجم كروموسوم بكتريا *E.coli* أو *Vibrio cholerae* (Smith وآخرون ، 2004) أن حجم الجينوم الصغير لأفراد كلا الجنسين *Campylobacter*، *Helicobacter* هو السبب الرئيس لحاجة هذه الأجناس لإضافة مدعمات النمو لأوساط تنميتها وكذلك فشلها في تخمير الكربوهيدرات أو تفكيك المركبات المعقدة وخمولها الحياتي الكيميائي بشكل عام (Goodman و Coorrea ، 2004).

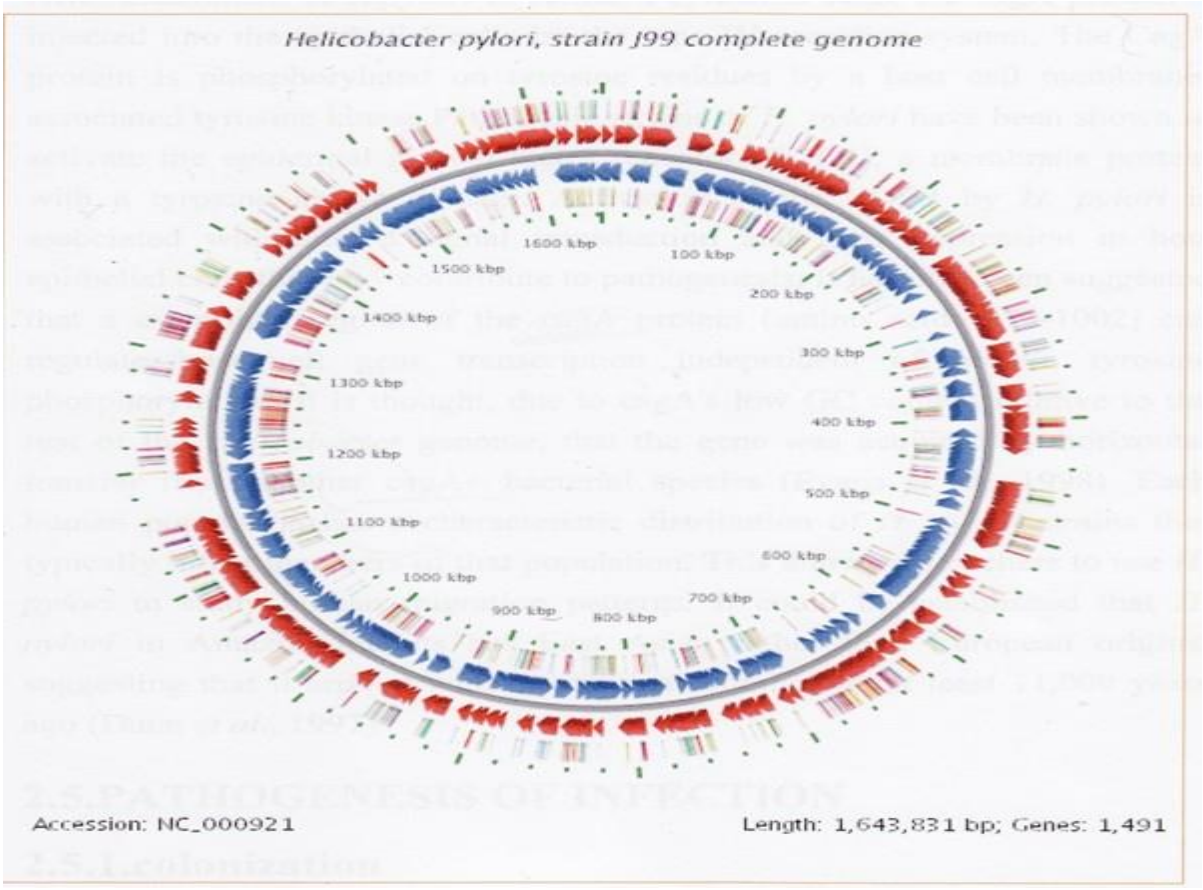
لوحظ أن جينوم هذهِ البكتريا يظهر تنوعاً وراثياً (genetic diversity) أكثر ويفوق ذلك الملاحظ في *C.jejuni* أو *C.coli* (Yan وآخرون ، 1991) فقد لوحظ أن من بين ثلاثين سلالة *H.pylori* اختيرت أظهرت سلالتان فقط تماثلاً جينومياً ببصمة الأصبع Identical Genomic (Finger) Prints وهذا يعكس حجم التغاير الوراثي الهائل (Significant genome variability) التي أثبتت بطريقة الترحيل الكهربائي بالهلام التقليدية (Conventional gel electrophoresis) للدنا الجينومي لبكتريا *H. pylori* (Langenberg وآخرون ، 1986 ؛ Owen واخرون، 1991).

لوحظ التنوع الوراثي بين سلالات *H.pylori* بتقنية الـ PCR باستعمال بادئات عشوائية (Arbitrary primers) (Akopyznts وآخرون ، 1992) كما أظهر النمط الوراثي (genomic patterns) لعزلات معينة لهذهِ البكتريا معزولة من مرضى لا تربطهم صلة قرابة درجة كبيرة من التغاير وبقيت هذهِ العزلات ثابتة في أثناء أعادة الزرع في المختبر ولوحظ أيضاً أن عزلات *H.pylori* المأخوذة من غار المعدة (Antrum) أو من جسم المعدة (Body of Stomach) لنفس المريض أظهرت تماثلاً في النمط الوراثي (genomic patterns) والنسق البروتيني (Protein Profiles) (Taylor وآخرون ، 1987).

لقد عرف التسلسل الكامل لجينوم عزلتي *H.pylori* (26695) و J99. إذ عُزلت *H.pylori* المسماة (26695) (الشكل 2–2) من مريض بريطاني مصاب بالتهاب المعدة (Gastritis) أما العزلة J99 من مريض أمريكي ذات أصل أوربي (Ethnic European) مصاب بقرحة الأثني عشر (Duodenal Ulcer) كلا السلالتين تحوي المنطقة الأمراضية cag PAI positive وتحوي التتابع s1 للجين *vacA*، لوحظ أن 6 % من الجينات الموجودة في جينوم (كروموسوم) أحدى السلالتين لا توجد في جينوم السلالة الأخرى (Devi وآخرون ، 2006) وأن السلالة J99 تحوي اثنان وخمسون جين مفقودة في السلالة 26695 بعدها قام باحثون بتحليل المحتوى الجيني لخمس عشرة سلالة *H.pylori* ومقارنتها بالعزلتين J99 و 26695 فقد لوحظ أن من بين 1643 جيناً التي تم تحليلها وجود 1281 جيناً شائعة الوجود في السلالات كلها تسمى بالجينات الجوهرية (Core gene) التي تشفر لمعظم العمليات الخلوية والأيضية البناء الحياتي والوظائف التنظيمية الأخرى . في حين 362 (22%) من هذهِ الجينات مفقودة من أحدى السلالات على الأقل تدعى الجينات الخاصة بالسلالة (Strain–Specific genes) ولهذهِ الجينات وظائف عدة منها ما تحتاجها لموقعها البيئي المتخصص (Specific niches) ويكون تسلسل الدنا في هذهِ الجينات متغاير وبشكل كبير بين السلالات. من الجينات الخاصة بالسلالات هي الجينات التي تشفر لبروتينات سطح الخلية (Cell surface protein) أحدى هذه الجينات. babA outer membrane protein (omp) التي تشفر للالتصاق بمستضد لويس الذي يظهر على سطح أنسجة المعدة عند بعض الأشخاص (Dumrese وآخرون ، 2009). الجينات

الأخرى الخاصة بالسلالة هي جينات نظام التحوير المقيد Restriction modification system (components) وجينات ألعناصر الانتقالية (Transposase) والتي تشفر للجينات التي تنظم عملية تبادل الدنا التنوع الوراثي بين البكتريا.

معدل محتوى G+C لهذهِ البكتريا هو 39% بناءاً على هذهِ الحقيقة فقد وضعت المنطقة الأمراضية PAI والمنطقة المرنة ضمن الجينات الخاصة بالسلالة لاختلاف محتواها من G+C. والمنطقة الأمراضية PAI هي قطعة دنا تحوي سبعاً وعشرين جيناً تتوارث قطعة واحدة من الناحية الأخرى فأن المنطقة المرنة (Plasticity zone) تظهر على إنها منطقة عالية الموزائيكية (Highly mosaic) إذ تحوي على عدداً من الأنزيمات القاطعة (Endonuclease) وأنزيمات الـ Transposases من هنا نستنتج أن هذهِ المنطقة تحدث فيها عمليات الإدخال (Insertion) والاستئصال (Excision) والاتحاد (Recombination) لوحظ أن معظم الجينات الخاصة بالسلالة (Strain–specific gene) لسلالتي 26695 ، J99 تقع في المنطقة المرنة (Salama وآخرون ، 2000). أستطاع مارشال وجماعتهِ تفسير إقامة بكتريا *H.pylori* لعقود في موقعها البيئي المحدد يعود لامتلاكها Strain– specific gene التي تشفر إلى بروتينات تساعدها في التكيف لعوائل متغايرة وراثياً (Genetically diverse hosts) (Marshall وآخرون ، 1998).



الشكل (2–2) المجين الكامل لبكتريا *H.pylori* (Tomb وآخرون 1996)

2–12 التنظيم الوراثي للبكتريا الحلزونية *H.pylori* Genetic regulation of

أن هذا التنوع الوراثي غير الأعتيادي الملاحظ في عزلات *H.pylori* يعزى إلى أن سلالات هذهِ البكتريا تعاني أعادة ترتيب وراثي (Genomic Rearrangement). ولهذا يحصل التغاير الكبير والواسع في النمط الوراثي بين سلالات *H.pylori* المعزولة من أشخاص مختلفين. يظهر تحليل تسلسل الجينوم الكامل لبكتريا *H.pylori* إلى أن هذه البكتريا طورت تجمعات جينية (Clusters of genes) داخل الجينوم في مناطق مميزة تسمى مناطق المرونة (Plasticity zones). وهذه تكون مشابهة للمناطق التي تشترك في الانتقال الأفقي للجينات . هذه الاكتشافات معتمدة على وجود تتابعات قصيرة ومناطق مشفرة تسمى(Integrating conjugative elements (ICEs تكون هذه التتابعات منتشرة على نطاق واسع في سلالات بكتريا *H.pylori* وتوفر المرونة الملائمة في عملية اعادة الاتحاد الوراثي (Recombination) وبالتالي يشجع عملية التهرب من الجهاز المناعي، وزيادة القدرة على الاستعمار، فضلا عن غيرها من التعديلات التي توفر ميزة انتقائية لهذا للكائن (Toft و Andersson ، 2010) وتدعم هذه الفرضية نتائج بحوث أجريت مؤخرا تشير إلى أن التعديلات الجينية تحدث بمعدل 10 مرات أسرع خلال العدوى الحادة أو في وقت مبكر عندما تواجه البكتريا استجابة المضيف المناعية مقارنة مع معدل حدوثها عند العدوى المزمنة. تشير هذه النتائج إلى أن معدل حدوث الطفرات (Mutation) في بكتريا *H.pylori* تكون عالية جدا وأن العديد من الطفرات تحدث في الجينات التي تشفر الى البروتينات الغشاء الخارجي (Linz وآخرون ، 2014) هذه البروتينات تدخل في عملية التفاعل بين المضيف والكائن الممرض (Host- pathogen Interaction) بحيث يحدث تغير مواقع الهدف للاستجابة المناعية المتكيفة المعروضة على السطح الخارجي للبكتريا لتحفز الإصابة المزمنة ببكتريا *H.pylori* (Linz وأخرون ، 2013).

التحويرات الوراثية في جينوم بكتريا *H.pylori* تشمل مثيلة الدنا (DNA methylation) والتي تحدث بواسطة انزيم (DNA methyltransferase) وتؤثر على التركيب الهندسي للجينوم والتعبير الجيني وتشفر بكتريا *H.pylori* عدد من انزيمات (DNA methyltransferases) إذ انّ تحليل التتابعات، الوراثية بين أن هناك اختلافات كبيرة في عملية المثيلة لتتابعات معينة في السلالات المتقاربة وهذه تعود إلى الاختلافات في تركيب الانزيم نفسهُ وكذلك الاختلاف في التتابعات المستهدفة من قبل الانزيم وتسهم هذه الميزات سويا في تغيير التنظيم الجيني والذي يشمل تنظيم تعبير (*flgE*) (الذي يشفر إلى المكونات التركيبية للأسواط) و(*cagY*) (الذي يشفر إلى مكونات النظام الافرازي الرابع) و (*ureC*) (الذي يشفر إلى وحدات معقد اليوريز) (Furuta وآخرون ، 2014)، هذه النتائج توكد أهمية ديناميكية التعبير (Expression Dynamics) وضرورة التعرف على عدد من العمليات التنظيمية التي

تتوسط التفاعلات المعقدة بين الممرض والمضيف حتى نفهم بشكل أوسع عمليات حدوث الإصابة المزمنة بهذه البكتريا (Kathren وآخرون ، 2015).

2-13 آليات مقاومة البكتريا الحلزونية للمضادات الحيوية

عند حدوث الإصابة المزمنة فان عملية إزالة الاستيطان البكتيري تتطلب اعطاء مضادات ميكروبية (Antimicrobial agent) ، والعلاج القياسي المستخدم للتخلص من الاصابة ببكتريا *H.pylori* هو العلاج الثلاثي والذي يتكون من مثبط مضخة البروتونات (PPI) proton pump inhibitor والاموكسيسيلين (Amoxicillin) و الكلرثرومايسين (clarithromycin) لكن العلاج الحالي المستخدم مع السلالات المقاومة يسمى العلاج الرباعي وهو نفس العلاج الثلاثي ولكن بإضافة المترونيدوزول (Metronidazole) (Ferreira و Moss ، 2014). وان المقاومة الميكروبة للمضادات الحيوية هي مشكلة منتشرة على نطاق واسع بين مسببات الأمراض البكتيرية الدراسات الحديثة تشير إلى ظهور سلالات مقاومة للمضادات الحيوية من بكتريا *H.pylori* في العينات السريرية. وفي محاولة لفهم أفضل الآليات الجزيئية التي تنظم مقاومة المضادات الميكروبية، وقد تم تحديد تسلسل الجينوم الكامل لتميز أنماط التغيرات الوراثية التي يمكن أن تكون مرتبطة مع التغيرات المظهرية التي تؤثر في مستوى الحساسية للمضادات الحيوية (Slinger وآخرون ، 2009). وتشير الدراسات إلى أن المقاومة بكتريا *H.pylori* للكلاريثروميسين تكون من خلال الطفرات في الجينات المشفرة للحامض الرايبي الرايبوسومي 23S rRNA وكذلك التعديلات ضمن الجينات التي تشفر الى عائلة TolC لمضخة التدفق (Efflux pumps)، وعلى العكس من ذلك فأن المقاومة للاموكسيلين تكون من خلال حدوث طفرات في المناطق المشفرة لبروتينات الغشاء الخارجي (*hop*) والبروتينات الرابطة للبنسلين (Penicillin–Binding proteins) (Qureshi وآخرون ، 2014). والمقاومة للمترونيدوزول (Metronidazole) تكون من خلال طفرات ازاحة قالب القراءة و عدم القراءة (Frameshift and nonsense mutations) في المناطق المشفرة *rdxA* or *frxA* او بالتناوب مع الموقع المنظم لامتصاص الحديد (*fur*)،تجعل العلاج الرباعي غير فعال في العديد من الحالات (Alfizah وآخرون ، 2014). وفي هذه الحالات عند فشل العلاج الثلاثي والرباعي يمكن أن يُعطى نوع ثاني من العلاج والذي يتضمن التتراسايكلين والفلوروكوينولس Tetracycline and (fluoroquinolones)، ولسوء الحظ ظهرت عزلات من بكتريا *H.pylori* مقاومة التتراسايكلين والفلوروكوينولس (Tetracycline and fluoroquinolones). ويبين التحليل التعاقبي للدنا (DNA sequencing) ان المقاومة للتتراسايكلين تكون عن طريق تغيير الموقع الهدف الذي يعمل عليه هذا المضاد بينما المقاومة للفلوروكوينولس تنتج عن طفرة في الشفرة 87 و 91 للجين *gyrA* (Cover و Blanke ، 2005).

الفصل الثالث المواد وطرائق العمل

3-1 المواد Materials

3-1-1 الأجهزة Instruments

الأجهزة المختبرية التي استخدمت في هذه الدراسة والمبينة في جدول (3-1).

جدول(3-1) الأجهزة المستخدمة في هذه الدراسة والمبين ونوعها ومنشأها

أسماء الأجهزة	الشركة	(المنشأ)
المؤصدة Autoclave	Hirayama	(Japan)
الناظور Endoscopy	Pentax	(Japan)
جهاز النبذ المركزي المبرد عالي السرعة High Speed Cold centrifuge	Memmert	(Germany)
جهاز النبذ المركزي Centrifuge	Gallenkamp	(England)
الدوار الحراري Thermo cycler	Eppendorf	(Germany)
الترحيل الكهربائي Electrophoresis set	Hellabio	(U.K)
مطياف القطرة النانوية Nanodrop spectrophotometer	Thermo	(U.S.A)
المقطر Disitllator	Gallenkamp	(England)
ثلاجة Refrigerator	Consort	(France)
حاضنة Incubator	Memert	(Germany)
حمام مائي Water bath	FisherScientific	(USA)
خلاط Vortex mixer	Griffin	(Germany)
فرن كهربائي Electric Oven	Gallenkamp	(England)
مجنس Homogenizer	Thermo	(Germany)
مجهر ضوئي Light microscope	Olympus	(Japan)
ميزان حساس Sensitive balance	Mettler	(Switzerland)
مقياس الأس الهيدروجيني pH-meter	Metrohm	(Switzerland)
هود Laminar Air Flow	Ishtar	(Iraq)
وحدة تصوير Gel document System	Consort	(France)

3-1-2 المستلزمات Equipments

المستلزمات المختبرية التي تضمنتها الدراسة والمبينة في جدول (3-2).

جدول(3-2) المستلزمات المختبرية المستخدمة في الدراسة الحالية والمبين نوعها ومنشأها

المستلزمات	الشركة	(المنشأ)
أغطية سلايدات Cover Slip	Marienfeld	(Germany)
أطباق بتري Petri Dish	(China)	(Citotest)
أنابيب مسطحة Plain Tube	Citotest	(China)
حاملات سلايدات Slides Holders	Racks	(Czechoslovakia)
سلايدات Slides	Machinery	(China)
وعاء لاهوائي Anaerobic Jar	Oxoide	(England)
وحدة ترشيح Filter unit 0.22 µm	Millipore	(Spain)
Micropipette 2-200 µl and Tips	Eppendrof	(Germany)
Micropipettes 100-1000 µl and Tips	Eppendrof	(Germany)

3-1-3 الأوساط الزرعية Cultures Media

الأوساط الزرعة المستخدمة لعزل وتشخيص بكتريا *H.pylori* والمبينة في جدول (3-3).

جدول (3-3): الأوساط الزرعية ، والشركة المنتجة ، والمنشأ

الوسط الزرعي	الشركة	(المنشأ)
أساس أغار اليوريا Urea Agar Base	Himedia	(India)
اساس مرق اليوريا Urea broth Base	Himedia	(India)
أغار نقيع القلب والدماغ Brain- Heart Infusion Agar	Himedia	(India)
أساس أغار الكولومبيا Columbia Agar Base	Himedia	(India)
مرق نقيع القلب والدماغ Brain- Heart Infusion Broth	Himedia	(India)

4-1-3 العدد التشخيصية The Diagnostic Kits

العدد التشخيصية الجاهزة المستخدمة في الدراسة والمبينة في جدول (3-4).

جدول (3-4) : العدد التشخيصية ، والشركة المنتجة ، والمنشأ

Diagnostic Bacteria Kit	Company	(Orgine)

(England)	Oxoid	Gas Generation (Microaerophilic) Kit
(USA)	GeneAid	Genomic DNA Extraction Kit
(German)	Acon	One Step H. pylori Test Device Kit
(Korea)	Bioneer	PCR PreMix kit
(Korea)	Bioneer	DNA Ladder (100-200bp)

3-1-5 الصبغات The Stains

الصبغات المستخدمة في هذه الدراسة والمبينة في جدول (3-5).

جدول (3-5) : الصبغات ، والشركة المنتجة ، والمنشأ

الصبغات	الشركة	(المنشأ)
محاليل صبغة غرام Gram Stain	Vaccine institute	(Iraq)
صبغة كربول فوكسين Carbol Fuchsin Stain	Vaccine institute	(Iraq)
صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide	BDH	(England)

3-1-6 البوادئ Primers

البوادئ المستخدمة في هذه الدراسة المبينة في جدول (3-6).

جدول (3-6): البوادئ المستخدمة هذه الدراسة

Primer	Sequence (5´→ 3´)		Size (bp)	Source
*ure*A	F	AGCGTTGGCAGTGCTAAAAG	411	NCBI Gene-Bank data base
	R	TTATAAGCCGCGCCATTAGC		
16SrDNA	F	ATCCTGGCTCAGAGTGAACG	1500	NCBI Gene-Bank data base
	R	GCAGGTTCACCTACGGTTACC		
*vac*A	F	ATGGAAATACAACAAACACAC	678	NCBI Gene-Bank data base
	R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3		
*cag*A	F	TGATGGCGTGATGTTTGTTGA	1320	NCBI Gene-Bank data base
	R	TCTTG GAGGCGTTGGTGTAT		

3-1-7 المواد الكيميائية Chemical Materials

المواد الكيميائية المستخدمة في هذه الدراسة والمبينة في جدول (3-7).

جدول (3-7): المواد الكيمياوية ، والشركة المنتجة ، والمنشأ

المواد الكيمياوية	الشركة	(المنشأ)
غليسرول Glycerol %20	Supermarket	(Iraq)
كحول الايثانول Ethanol	BDH	(England)
مواد معززة للنمو Growth Supplement (Ferrous sulfate -sodium metaBisulfite -sodium Pyruvate)	BDH	(England)

(Iraq)	Samarra	Polymyxin B
(Iraq)	Samarra	Trimethobrim
(England)	DBL	Vancomycin
(England)	BDH	EDTA (Ethyle Dimethyl Tetra Acitc acid)
(U.S.A)	Sigma	Tris-Base التـرس القادي
(England)	BDH	Uric acid powder مسحوق حامض اليوريك
(U.S.A)	Sigma	Agarose أكاروز
(England)	Oxoid	Hydrogen peroxide بيروكسيد الهيدروجين
(England)	BDH	N,N,N,-Tetra methyl-P phenylene diamine dihydrochloride

3-1- 8 الكواشف والمحاليل Reagents and Solution

3-1-8-1 كاشف إنزيم الاوكسديز Oxidase Reagent

تم تحضير كاشف إنزيم الاوكسديز آنيا بإذابة 0.01 غم من مادة Tetramethyl-p-phenylene diamin dihydrochloride في 1 مل من الماء المقطر ، وتم حفظهِ في مكان مظلم ، ومن ثم أُستخدم للكشف عن قدرة بكتريا *H. pylori* على إنتاج إنزيم Oxidase Cytochrome (Blaser ، 2005).

3-1-8-2 كاشف إنزيم الكاتاليز Catalase Reagent

استخدمت مادة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 3% للكشف عن قدرة بكتريا *H. pylori* لإنتاج إنزيم الكاتليز Catalase الذي يحلل بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء و أوكسجين يظهر بشكل فقاعات (Macfaddin ، 2000).

3 -1-8-3 محلول سكيرو Skirrows Solution

تم تحضير هذا المحلول حسب تعليمات الشركة المصنعة (Himedia /India) ، والذي يتألف من خليط من باودر للمضادات الحيوية التالية: Vancomycin 5.00 mg , Polymyxin-B 1250 IU Trimethoprim 2.50 mg، أذيبت مكونات العبوة الواحدة في 2 مل من الماء المقطر مع التحريك الهادئ لتجنب تكون الرغوة ، وبعد ذلك اضيفت الى 500 مل من وسط أغار الكولومبيا المبرد بدرجة 45 -50 م°. يجعل هذا المحلول وسط الكولومبيا انتقائي لتنمية بكتريا *H.pylori* ويمنع نمو الأنواع البكتيرية الأخرى لكي يُسهل عزل هذه البكتريا من العينات السريرية والتي تحتوي على أنواع عديدة من الأحياء المجهرية. (السلمي ، 2010).

3-1-8-4 محلول TBEبقوة10X

حُضر هذا المحلول بأذبة 108 غرام من مسحوق مادة التـرس القاعدي Tris- Base و 5 غرام من مسحوق حمض اليوريك في 800 مل من الماء المقطر ثم أُضيف 40 مل من مادة EDTA (0.5

مولار ذي أس هيدروجيني 8) إلى الخليط وبعدها أُكمل الحجم بالماء المقطر الى 1 لتر وعقم بالمؤصدة بدرجة 121 مº لمدة 15 دقيقة وحفظ بشكل محلول خزين (Stock solution) وعند الاستعمال يخفف 10 مرات بالماء المقطر ليصبح محلول TBE بقوة 1X (Al-Segar ، 2007).

3-1-8-5 صبغة بروميد الأثيديم (Ethidium Bromide)

حُضرت بتركيز 10 ملغم/ مل وذلك بإذابة 100 ملغم من مسحوق الصبغة في 100 مل من الماء المقطر ثم حفظت في قنينة معتمة في درجة حرارة 4°م لحين الاستعمال.(Kumar وآخرون ، 2010).

3-1-8-6 دم بشري Human Blood

حُصِلَ عليه من مصرف الدم التابع لمستشفى بعقوبة التعليمي

3-1-8-7 المحلول الفسيولوجي Normal saline

من إنتاج شركة (ادويك) ,أستخدم هذا المحلول في حفظ الخزعات النسيجية من لحظة جمعها إلى عملية زرعها، او تجراء الفحوصات الاخرى عليها.

3-2: الأوساط الزرعية

3-2-1: وسط سكرو Skirrow's medium

أستُخدِم هذا الوسط لغرض العزل الأولي لبكتريا *H. pylori* ، إذ حضر هذا الوسط من إضافة وسط أغار الكولومبيا المعقم ، ثم أضيفت خليط المواد معززة النمو (Growth Supplement) التي تشمل ثلاثة مواد هي (Ferrous sulfate, sodium metaBisulfite, sodium Pyruvate وبحجم 5 ملغم من كل واحدة منها وذوبت في 3 مل من الماء المقطر مع التحريك الهادئ ويتم تعقيمها بواسطة وحدة ترشيح ذات ثقوب بقطر 0.2µ 2m، وتضاف إلى 500 مل من الوسط، وأضيفت له ايضاً المواد المحددة لنمو الملوثات البكتيرية؛ وذلك عن طريق إضافة محلول السكيروز (SkirrowsSupplementIII) الحاوي على المضادات الحيوية الذي تم تحضيره وفق الفقرة (3-1-8-3) بعدها أضيف له الدم البشري بنسبة 5% مع التحريك المستمر ثم يُصب في أطباق ، إن هذا الوسط يمكننا من الحصول على مستعمرات نقية وخالية من التلوث مما يجعله من الأوساط المفضلة في تشخيص بكتريا *H.pylori* عن غيرها من الأنواع البكتيرية (Skirrows ، 2002).

3-2-2: وساط اغار الدم Blood Agar

استُعمِل هذا الوسط لتنقية المزرعة البكتيرية في اول خطوة بعد العزل الاولي (Primary isolation), ولادامة البكتريا ايضاً ، وحُضر من اغار الدم الاساس (Agar Blood Base). مضافاً اليه دماً بشرياً متحللاً بنسبة (5%) وذلك حسب تعليمات الشركة المصنعة (OXoid) (Al-Sulami ، وآخرزن ،2013).

3-2-3- وسط نقيع القلب والدماغ Brain Heart Infusion Broth

أستعمل هذا الوسط لتنشيط نمو بكتريا *H.pylori* وحفظها بعد العزل وقد حضر هذا الوسط حسب التعليمات للشركة المصنعة ، ثم ترك ليبرد قليلا بعدها صب في أنابيب معقمة ونظيفة بعدها أضيف له الغليسرول المعقم بنسبة 20% إلى الوسط ثم تم تلقيحه بمستعمرات العزلات المراد حفظها المنماة على وسط السكيروز بعمر 24 ساعة باستخدام الناقل وحضنت لمدة 24-48 ساعة في درجة حرارة 37 وحفظت القناني في درجة حرارة - 20 مº، استخدم هذا الوسط في حفظ العزلة لمدة 6 أشهر (Al-Segar ، 2007).

3-3 طرائق التعقيم

1-3-3 التعقيم بواسطة الحرارة

عقمت الاوساط الزرعية السائلة والصلبة والمحاليل بالمؤصدة في درجة حرارة (121)مْ مدة(15) دقيقة وتم تعديل الرقم الهيدروجيني للأوساط الزرعية والمحاليل المستخدمة بإضافة قطرات محلول هيدروكسيد الصوديوم (40%) أو حمض الهيدروكلوريك HCl 5 عياري، أما الزجاجات فعقمت جميعها بالفرن الكهربائي في درجة حرارة(180 – 200مْ مدة ساعتين). (الربيعي ، 2006).

2-3-3: التعقيم بواسطة الترشيح

عقمت المحاليل التي تتأثر بالحرارة مثل مضادات الحياة وإضافات النمو باستعمال مرشحات غشائية بقطر 0.22 ميكروميتر.

4-3 طرائق العمل

1-4-3: جمع العينات Sampling

أُجريت هذه الدراسة للفترة من بداية تشرين الأول2015 إلى نهاية شباط 2016 في شعبة الناظور التابعة لمستشفى بعقوبة التعليمي، وتم أجراء 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، وقام بإجراء فحص الناظور الطبيب الاختصاص في الجراحة العامة الدكتور احمد علوان القيسي بعد أخذ موافقة جميع المرضى على أخذ العينات علماً أن اخذ العينات هو أجراء روتيني في المستشفيات الأوربية والهندية. 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 أي من أمراض المعدة والأمعاء) وعددهم 30 مريضا Patients group

أخضعت كلا المجموعتين لاستئصال الخزعات النسيجية حيث أُخِذت ثلاث خزعات لتجنب التوزيع البقعي (Patchy) لهذه البكتريا داخل بطانة المعدة وأُخذت من أماكن مختلفة لغار المعدة (Antrum) وهو المكان المفضل لتواجد بكتريا *H.pylori* لكي تتجنب الخلايا الجدارية المفرزة للحامض (Acid-secreting parietal cells) (Kuster وآخرون ، 2006 ؛ Kaore وآخرون ، 2012). و

وأُخِذ (5مل) دم من كلا المجموعتين وتم فصلها بواسطة جهاز النبذ المركزي للحصول على المصل (Serum) بعد الحصول على العينات أجريت عليها الاختبارات التالية:

1. اختبار اليوريز السريع Rapid urease test
2. اختبار الاستنبات البكتيري Bacterial culture test
3. التحري عن الأجسام المضادة IgG لبكتريا *H. pylori*
4. استخلاص الدنا DNA من الخزعات النسيجية للكشف عن الجين التشخيصي وجينات الضراوة لبكتريا *H.pylori* بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

- أجريت جميع هذه الاختبارات في مختبر الأحياء المجهرية وفي وحدة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR في قسم علوم الحياة- كلية العلوم- جامعة ديالى.

3-4-2: زرع العينات Culturing

أُستِخدمت طريقة بارسونيت **(**Parsonnat وآخرون ، 1988) في زرع العينات وعلى النحو الآتي :-

1. بعد وصول العينات السريرية إلى المختبر وخلال مدة لا تتجاوز الساعتين من الوقت تم سحق ومجانسة **(**Homogenization**)** عينات الخزعات النسيجية المخصصة لعزل الجرثومة بوساطة جهاز المجنس **(**Homogenizer**)** جيداً حتى يتحول النسيج إلى مزيج متجانس**.**
2. لُقح وسط سكرو بـ0.1 مليلتر من المزيج النسيجي، وبوساطة الناقل يتم نشر اللقاح في الطبق بطريقة التخطيط (Streaking) وبمعدل مكررين لكل طبق.
3. نُقلت بعدها الأطباق إلى وعاء لاهوائي (Anaerobic Jar) . ثم وضعت عدة تحرير الغاز (Gas generating kit) ونشطت باضافة 10 مليلترات من الماء المقطر إلى محتويات العدة، وأغلقت الحاضنة بأحكام لغرض توفير الظروف الغازية المطلوبة وهي: 5% من غاز الأوكسجين، و 10% من غاز ثاني أوكسيد الكاربون، و 85% من غاز النيتروجين .
4. وضُع الوعاء اللاهوائي في الحاضنة في درجة 37 م لمدة (7 – 14) يوم.
5. بعد انتهاء مدة الحضانة. تم تشخيص البكتريا بوساطة الفحوصات الكيموحيوية والطرائق التشخيصية الأخرى المعتمدة.
6. نُشطت العزلات على وسط وسط نقيع القلب والدماغ Brain Heart Infusion Broth والحاوي على 20% غليسرول لمدة 24-48 ساعة وحفظها بعد ذلك في درجة حرارة -20 وكما مبين في المخطط (3-1).

3-4-3: اختبار انزيم اليوريز السريع (Rapid urease test)

وضعت الخزعات النسيجية المأخوذة من المرضى في انابيب اختبار Test tube حاوية على 5 ملليتر من وسط اليوريا السائل (Urea broth). حضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة . يلاحظ بعد ذلك تحول لون الوسط من الأصفر إلى الوردي دلالة على إيجابية الاختبار واحتواء الخزعات النسيجية على بكتريا *H.pylori* (Blanchard و Nedrud ، 2012).

3-4-4: تشخيص بكتريا *H. pylori*

شُخصت بكتريا *H. pylori* بالاعتماد على ما جاء في (Holt وآخرون ، 1994). وبالطرائق التالية:

3-4-4-1: ملون غرام (Gram Stain)

استخدمت طريقة ملون غرام التقليدية مع مراعاة استبدال ملون السفرانين بالكاربول فوكسين 0.75%لتلوين خلايا مستعمرات البكتريا المراد تشخيصها باللون الأحمر الفاتح وظهورها بشكل أوضح.

3-4-4-2: اختبار انزيم الاوكسديز (Oxidase test)

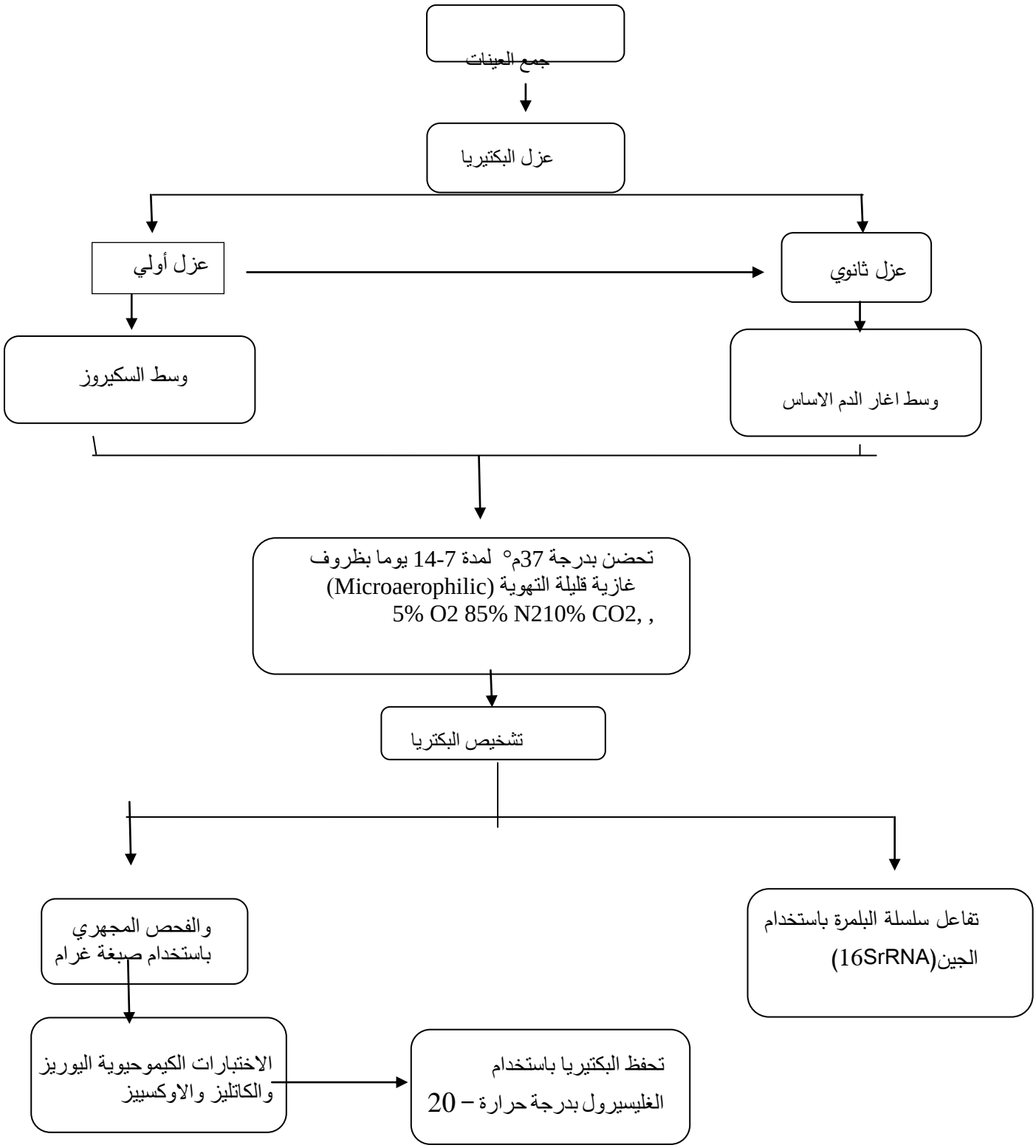
وضعت قطرات من كاشف انزيم الاوكسديز والذي حُضر من مادة (N,N,N,-Tetra methyl-P phenylene diamine – dihydrochloride) بنسبة 1 % في الماء المقطر ثم نقل جزء من المستعمرة بواسطة العود الناقل على ورقة ترشيح ومزج مع القطرة . تكون لون بنفسجي غامق خلال عدة ثواني دلاله على ايجابية الاختبار (Forbes وآخرون ،1998).

3-4-4-3: اختبار انزيم الكاتاليز (Catalase test)

وضعت قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين (بتركيز 3%) على شريحة زجاجية نظيفة ومعقمة ونقل جزء من المستعمرة وخلط مع القطرة بوساطة العود الناقل. ظهور فقاعات هوائية خلال 20 – 30 ثانية دلاله على ايجابية الاختبار (Tadesse و Alem ، 2006).

3-4-4-4-اختبار انزيم اليوريز(Urease test)

استخدم وسط اليوريا الصلب لهذا الاختبار؛ إذ لقحت أنابيب حاوية على5 مليلتر من وسط اليوريا الصلب بهذه البكتريا، وحضنت في درجة 37 م لمدة 24-48 ساعة. يستدل على ايجابية الاختبار من تغيير لون وسط اليوريا الصلب من الأصفر إلى الوردي (Al-Dhaer ، 2001).


جمع العينات
عزل البكتيريا
عزل أولي
عزل ثانوي
وسط السكيروز
وسط اغار الدم الاساس
تحضن بدرجة 37م° لمدة 7-14 يوما بظروف غازية قليلة التهوية (Microaerophilic) 5% O2 85% N210% CO2, ,
تشخيص البكتريا
والفحص المجهري باستخدام صبغة غرام
تفاعل سلسلة البلمرة باستخدام الجين(16SrRNA)
الاختبارات الكيموحيوية اليوريز والكاتليز والاوكسييز
تحفظ البكتيريا باستخدام الغليسيرول بدرجة حرارة – 20

مخطط(3-1) عزل وتشخيص وحفظ بكتريا *H.pylori*

3-4-5 اختبار 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 مصل الدم (serum) المأخوذ من جميع العينات الداخلة في الدراسة 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 200µl من المصل إذا كان هذا المصل يحتوي على الأجسام المضادة (IgG) المتكونة ضد البكتريا يتفاعل مع جزيئات مستضد البكتريا المغلفة لسطح الحفرة ، هذا التفاعل يؤدي إلى تغير لون الخط الذي يظهر في منطقة الفحص (Test) ممّا 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) ممّا يدل على أنّ كمية مناسبة من المصل تمت إضافتها , وتحسب خلال 10 دقيقة بعدها تهمل ، إن الحساسية لهذا الاختبار هي 99.0 % والنوعية 86.7 % (Chen وآخرون ، 2002)

3-5 التشخيص ودراسة جينات الضراوة بتقنية الـ PCR

3-5-1 استخلاص الدنا الجينوم من النسيج Extraction of Genomic DNA (Tissue)

تم استخلاص الدنا الجينوم وذلك باذابة عينات الخزعات النسيجية (Biopsies) المجمدة لدرجة حرارة الغرفة وتكمل الخطوات حسب التعليمات المثبتة في طريقة العمل للعدة (Geneaid extraction genomic DNA kit) و تلخص فيما يلي:

1. توضع عينة الخزعة النسيجية (Biopsy) في أنبوبة دقيقة سعة 1.5 مل و يضاف لها 200 µl من GST Buffer وتجانس العينة باستخدام Mcropistlle المجهز مع العدة. المجانسة الجيدة للنسيج قبل المعاملات اللاحقة سوف يسهل عمليات هضم البروتينات وتحليل الخلايا ويزيد من حاصل الدنا.
2. يضاف µ 20 من انزيم هضم البروتينات (Proteinase K) إلى مزيج العينة ويمزج بجهاز المازج بشكل جيد ثم الحضن في حمام مائي 60مْ لمدة 60 دقيقة خلال فترة الحضن تقلب العينة كل 5 دقائق، وخلال هذه الفترة تحضر الكمية المطلوبة من محلول الاسترداد Elution buffer (المطلوبة في الخطوة8) بوضعها في الحمام المائي ايضا .

3. عد انتهاء فترة الحضن في الحمام المائي وبقاء بعض المواد غير الذائبة تنبذ العينة في جهاز النبذ المركزي الدقيق بسرعة 14000-16000 rpm ولمدة دقيقتين وينقل الرائق بعناية الى انبوبة 1.5مل جديدة ويهمل الراسب.
4. يضاف 200 µl منGBT Buffer و رج العينية بشدة لمدة 10 ثوان .(للحصول على محلول متجانس) ويضاف 200 µl من الايثانول المطلق للمزيج ويرج مباشرة بشكل جيد لمدة 10 ثوان(في حال ظهور راسب يمنع تكونه بواسطة الماصة قدر الامكان) و ينقل جميع المزيج(مع الترسبات إن وجد) إلى عمود GD المركب على انبوبة الجمع سعة 2 مل ويوضع في جهاز النبذ المركزي الدقيق بسرعة 14000-16000 rpm لمدة دقيقة واحدة .
5. تهمل انبوبة الجمع وتوضع انبوبة جمع 2 مل جديدة الى عمود GD ويضاف له 400µl من W1 Buffer ويوضع في جهاز النبذ المركزي الدقيق بسرعة 14000-16000 rpm لمدة 30 ثانية .
6. يهمل الراشح المتكون في انبوبة الجمع وتعاد الأنبوبة إلى عمود GD ويضاف لها 600µl من Wash Bufferويوضع في جهاز النبذ المركزي الدقيق بسرعة 14-16000 rpm لمدة 30 ثانية . يهمل الراشح المتكون في انبوبة الجمع وتعاد الانبوبة إلى عمود GD ويوضع في جهاز الطرد المركزي الدقيق بسرعة 14000-16000 rpm لمدة 3 دقائق للتجفيف .
7. استرداد الدنا(DNA Elution) : حجم محلول الاسترداد القياسي هو 100 µl . أما إذا كانت العينة المستخدمة صغيرة يقلل محلول الاسترداد إلى 30-50 µl للحصول على تركيز دنا أعلى . اذا كان المطلوب كمية كبيرة من الدنا (DNA) تعاد خطوة الاسترداد ويكون حجم محلول الاسترداد الكلي المستخدم هو 200 µl .

- يوضع عمود GD المجفف إلى أنبوبة دقيقة سعة 1.5 مل نضيفه ويضاف محلول الاسترداد المسخن مسبقا بعناية الى مركز عمود GD .
- يترك لمدة 5 دقائق للتأكد بأن محلول الاسترداد امتُصّ بالكامل خلال عمود GD .
- يوضع الخليط في جهاز الطرد المركزي الدقيق بسرعة 14000-16000 rpm لمدة 30 ثانية لاسترداد الدنا النقي Purified DNA (Marais وآخرون ، 1999 ؛ Stephanie وآخرون ، 2001).

3- 2-5 تقدير تركيز الدنا ونقاوتهEstimation DNA Concentration and Purity

يقدر تركيز الدنا في العينة باستخدام جهاز مطياف القطرة النانوية Nanodrop specrophotometer ، وذلك بإضافة 1µl من الدنا المستخلص يضاف إلى الجهاز لتقدير التركيز في النانو كرام / مايكرو ليتر ng/µl، تركيز العينة يكون 3-5 ng/ µl، والنقاوة تقدر من خلال الامتصاصية 260/280 nm (OD) ، لتحديد في ما اذا كانت العينة ملوثة بالبروتينات أو بالحامض النووي الرايبوسومي RNA , الامتصاصية المقبولة على 260/280 لتركيز الدنا النقي تكون بين 1.8 -2 نانوميتر (Sambrook و Russell ، 2001).

3-5-3 تشخيص بكتريا *H.pylori* والكشف عن بعض الجينات المسؤولة عن ضراوتها بواسطة جهاز الدوار الحراري (Thermalcycler)

استُخدِمت هذه الطريقة للتأكد من وجود المادة الوراثية (DNA) لبكتريا *H.pyori* في الخزعة النسيجية (Biopsy) وذلك عن طريق الكشف عن الجين (16S rDNA) الخاص بهذه البكتريا والكشف عن جينات ضراوة لهذه البكتريا مثل (*ureA*، *vacA* ، *cag A*) ذلك باستخدام بادئات متخصصة لمضاعفة هذه الجينات والكشف عنها بواسطة الترحيل الكهربائي من خلال حجومها المختلفة*ure*A(411bp)، 16S*rDNA*(1500bp) ، *VacA* (678bp) و *CagA* (1320bp) (Jabbar و Al-Obaidi ، 2015).

1-3-5-3 تحضير البادئات Primers Preparation

جُهِزت البادئات من قبل شركة (Bioneer) الكورية على شكل (lyophilized) وبتراكيز مختلفة بالبيكومول (Picomole) . وأُذيبت هذه البادئات بالماء المقطر خالي الايونات (Deionized distilled water) حيث تكون بتركيز نهائي(100 pmol/µl) وتحفظ عند20-مْ لحين الاستعمال ، استخدمت هذه البادئات بتحضير محلول (working solution) وذلك بأخذ جحم (10µl) من المحلول الخزين (stock solution) واضافته الى (90µl) من الماء المقطر (ddH_2O) خالي الايونات للحصول على تركيز (10pmol/µl) من محلول (working solution) (Ali ، 2013).

2-3-5-3 تحضير وسط تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

حضر وسط التفاعل حسب تعليمات الشركة المصنعة وذلك باستخدام العدة (AccuPower® PCR PreMix Kit) كما موضح في جدول **(3-8)**.

جدول (3- 8) مكونات وسط التفاعل المستخدمة لتضاعف الدناDNA

PCR Master mix	Volume (µL)
DNA template	5
Forward primer (10pmol)	1.5
Reveres primer (10pmol)	1.5
PCR water	12
Total volume	20

مكونات التفاعل المذكورة أعلاه موضوعة في ألانابيب الموجود في العدة القياسية (AccuPower PCR PreMix Kit) والتي تحتوي على جميع المكونات الأخرى اللازمة لإجراء التفاعل وهي (dNTPs, Tris-HCl pH: 9.0, KCl, $MgCl_2$,stabilizer, TaqDNA polymerase, and tracking dye) وجميع انابيب التفاعل مزجت بواسطة (vortex) وبسرعة (3000rpm) ولمدة 1 دقيقة وبعد ذلك وضعت في جهاز (PCR Thermocycler) وباستخدام النظام (Convential PCR thermocycler system) وكما موضحة في جدول (3-9 ، 3-10 ، 3-11 ، 3-12). (Essawi وآخرون ، 2013 ؛ Banerjee وآخرون ، 2014).

جدول (3-9) برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل المستخدم لتضخيم الجين (16S rDNA)

PCR step	**Temperature (**C°)	Time	repeat
Initial Denaturation	95	5min	1
Denaturation	95	30sec.	30 cycle
Annealing	58	30sec	
Extension	72	2 min	
Final extension	72	10min	1
Hold	4	Forever	-

جدول (3-10) برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل المستخدم لتضخيم الجين(*ure* A)

Steps	Temperature (Cº)	Time	Number of cycle
Initial	94	5 min	1
Denaturation	93	1 min	35
Annealing	55	30 sec	
Extension	72	1 min	
Final extension	72	10 min	1

جدول (3-11) برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل المستخدم لتضخيم الجين (*vacA*)

Steps	Temperature (Cº)	Time	Number of cycle
Initial	94	5 min	1
Denaturation	94	30 sec	35
Annealing	56	30 sec	
Extension	72	30 sec	
Final extension	72	5 min	1

جدول (3-12) برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل المستخدم لتضخيم الجين *cagA*

Steps	Temperature (Cº)	Time	Number of cycle
Initial	95	5 min	1
Denaturation	95 º	1min	42
Annealing	65º	1min	
Extension	72	1min	
Final extension	72	5 min	1

3- 5-4 الكشف عن ناتج تفاعل الـ PCR وتقدير الأحجام الجزيئية لدنا

يتمُ ذلك من خلال عملية الترحيل الكهربائي لعينات الدنا التي تم مضاعفتها بواسطة جهاز المدوار الحراري (Thermalcycler) باستعمال هلام (جل) كما استخدم الدليل الحجمي (DNA ladder) بحجم (100 bp - 2000) وذلك للتعرف على حجم الحزم الناتجة من تفاعل الـ PCR. (Rimbara وآخرون ، 2013).

3-5-5 طريقة تحضير هلام الأغاروز 1%

يتم تحضير هلام الاغاروز بتركيز 1% وذلك بإذابة 0.5 غرام من مسحوق الاغاروز في 50 مل من محلول (1X TBE buffer) والمحضر في الفقرة (3-1-8-5). سُخن المحلول حتى الغليان وتم مجانسة المحلول حتى يتحول الى شكل رائق، وبعدها ترك ليبرد بدرجة حرارة الغرفة، يُضاف 1مايكرو ليتر من صبغة بروميد الاثيديم (0.5mg/ml) للمحلول ويمزج بشكل جيد؛ وذلك برج المحلول برفق. يصب

الخليط في لوح التحميل (Tray) والذي يكون مثبت به مسبقا المشط (Combo) الخاص بتكون الحفر اللازمة لتحميل عينات الدنا، ويترك في درجة حرارة الغرفة ليتصلب لمدة 45 دقيقة، يوضع اللوح في حوض الترحيل (Gel tank) ويرفع المشط بهدوء، وتوضع تحت حوض الترحيل صفيحة سوداء معتمة لظهور الحفر بشكل واضح و يملأ حوض الترحيل بمحلول (1X TBE buffer) حتى تغطي الهلام. توضع عينات الدنا في الحفر بواسطة ماصة دقيقة (Micropipette) وبحجم 10 ماكروليتر من كل عينة مع مراعاة عدم خروج العينة من سطح الحفرة ويوضع الدليل الحجمي (DNA ladder) في الحفرة المخصصة له على أحد جانبي الهلام وبحجم 5 مايكروليتر، بعدها تجرى عملية الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) بإيصال أقطاب التيار الكهربائي ويجهز بقدرة 80 فولت ويتم الترحيل باتجاه القطب الموجب وبعد 1 ساعة وعند وصول الصبغة الزرقاء إلى ما قبل نهاية الهلام يتم أيقاف الترحيل ونُقل الهلام الى جهاز الأشعة فوق البنفسجية (UV Trans-illuminator) وعلى طول موجي 320 نانومتر لرؤية حزم الدنا وتقدير حجمهُ الجزيئي بالمقارنة مع الدليل الحجمي وصوّر الهلام باستعمال جهاز التصوير (Sambrook و Russell، 2001) .

6-3 التحليل الاحصائي . Statistical analysis

أُجِري التحليل الإحصائي باستخدام برنامج الحزمة الاحصائية (Statistical package for social sciences) ذي الاصدار رقم 22 فيما يتعلق بالمتغيرات ذات الصيغة الوصفية و تم وصفها بصيغة العدد والنسبة المئوية وتمت المقارنة باستخدام اختبار مربع كاي أما بالنسبة للمتغيرات ذات الصيغة العددية فقد تم وصفها باستخدام المعدل والانحراف المعياري للمعدل وتمت المقارنة بين المجاميع باستخدام اختبار t-test بين مجموعتين ، وعند درجة معنوية 0.05 (Levesque, 2007) .

الفصل الرابع النتائج والمناقشة

4 . النتائج والمناقشة Result and Discussion

4-1الحالات المرضية المشخصة بواسطة الناظور

بعد اخضاع المرضى لفحص الناظور لوحظ سيادة التهاب المعدة المزمن بنسبة 40%(12) وجاءت قرحة الأثني عشر ثانيةً بنسبة 23.34% (7) في حين ظهرت قرحة المعدة بنسبة 16.67% (5) ، أما مرض الارتجاع المريء المعدة فكانت نسبته 13.33% (4) وشكلت حالات سرطان المعدة أقل نسبة حيث كانت 6.67%(2). كما أظهرت النتائج وجود فرق معنوي ذو دلالة إحصائية بين الأمراض المختلفة إذ أن (P value) تساوي (0.04) وكما مبين في الجدول (4-1).

جدول (4-1) 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	

يلاحظ سيادة حالة الإصابة بالتهاب المعدة المزمن(Chronic gastritis) إذ شكل 40% الحالات وأقلها حالة سرطان المعدة (Gastric cancer) وكانت نسبته 6.67%. وهذا قد يكون مرتبط مع تطور المرض الذي يبدأ بالتهاب المعدة ومع مرور الوقت يتحول إلى قرحة المعدة أو الأثني عشر وفي بعض الحالات سرطان المعدة. هذه النتائج تتفق مع الدراسات المحلية التي حصل عليها Jabbar (2015)أذ بينت في دراستها سيادة التهاب المعدة المزمن (Chronic gastritis) بنسبة 40% بينما لوحظ سرطان المعدة بأقل نسبة حيث كانت3% وكذلك تتفق هذه النتائج مع الدراسات التي اجراها

الظاهر(2001) والهادي (2001) إذ سجلت الباحثتان التهاب المعدة المزمن(Chronic gastritis) وكانت النسب المسجلة 41.5% و38% على التوالي بينما لاحظ محمد (2004) سيادة التهاب المعدة المزمن كذلك بنسبة 33.8%، وأشار حسين (2002) في دراستهِ إلى شيوع قرحة الأثني عشر بنسبة 30% في حين ظهر التهاب المعدة ثانيةً بنسبة 20%. أما Weijmen وآخرون (2001) فقد لاحظوا ظهور قرحة المعدة بنسبة قليلة جداً هي 1.5% وشيوع مرض الارتجاع المريء المعدة GERD في المملكة المتحدة عند المرضى المشخصين بالناظور المعدي بنسبة سيادة 41.2%. ويبدو أن توزيع الأمراض يكون بشكل متنوع ، وهذا يعتمد على اختيار المرضى الذين أرسلوا إلى وحدة الناظور و فوعة (Virulence) لسلالات بكتريا *H. pylori* التي تحدث الاصابة ، ونوع و مدى استجابة المضيف المناعية للإصابة بهذه البكتريا، (Zheng ، 2011). أو تُعزى إلى عدة عوامل مثل فصيلة الدم O ، والازدحام ، والثقافة ، والتدخين، والعامل الوراثي وضعف الحالة الاقتصادية (الراوي ، 2005).

4-2 توزيع مجموعتي الدراسة حسب الجنس

شكلت نسبة الذكور في مجموعة المرضى 56.66%(17عينة) ونسبة الاناث43.33%(13عينة). أما مجموعة السيطرة فكانت نسبة الذكور50% (5عينات) ونسبة الإناث أيضا50% (5عينات). اظهرت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة عدد الذكور المصابين بأمراض المعدة والأمعاء اكثر من نسبه عدد الإناث مع عدم وجود فرق معنوي ذو دلالة احصائية بين الجنسين وكذلك بين المجموعتين حيث ان (P value) تساوي (0.585) وكما موضح في الجدول (4-2).

جدول (4-2) توزيع مجموعتي الدراسة وحسب النسب المئوية بالنسبة للجنس .

الجنس	مجموعة المرضى	مجموعة السيطرة
الذكور	%56.66 (17)	%50(5)
الاناث	%43.33(13)	%50(5)
المجموع	%100 (30)	%100 (10)
P value	0.585	

إن زيادة نسبة الإصابة بهذه الأمراض عند الرجال وقد يعود إلى المجهود اليومي الذي يتعرض له الرجال مقارنة بالنساء، وإلى عوامل أُخرى تكون سائدة بالرجال دون النساء مثل التدخين وتناول الكحول (البداوي، 2007) ، أو أن قلة الإصابة بالأمراض المعوية لدى الإناث مقارنة بالذكور ربما يعود إلى المضادات الحيوية التي تأخذها الأنثى على مدى الحياة (خلال الحمل ، بعد الولادة ، في حالات

الإجهاض، و خلال اصابات البولية التناسلية Urogenital infection) إذ أن هذه المضادات تثبط نمو بكتريا *H.pylori* التي تعتبر المسبب الرئيس لحدوث أمراض المعدة والأمعاء وبذلك تقل فرصة حدوث هذه الأمراض (Graham وEl-Omar ، 2013). وبالإضافة إلى ذلك فان نتائج الدراسة الحالية جاءت متوافقة مع نتائج الدراسة التي أجراها Ali (2013) على 74 شخص يعانون من أمراض معوية ومصابين ببكتريا *H.pylori* كانت نسبة الذكور54.05% (40) ونسبة الإناث 45.95 % (34).

4-3 الفئات العمرية لمجموعتي الدراسة .

تبين في الدراسة الحالية أن الفئة العمرية 20 – 39 سنة اقل نسبة للإصابة بأمراض المعدة والأمعاء حيث سجلت 20% وتليها والفئة العمرية >60 سنة و بنسبة 26.66%، أما الفئات العمرية 40 – 59 سنة فكانت أعلى مستوى للإصابة وبنسبة 53%. وبالمقارنة مع مجموعة السيطرة لم تظهر هذه الدراسة فرق معنوي ذو دلالة احصائية بين الفئات العمرية بين المجموعتين حيث أن (P value) تساوي (0.911) وكما موضح في الجدول رقم (4-3).

جدول رقم (4-3) الفئات العمرية والنسب المئوية لمجموعتي الدراسة .

الفئة العمرية	مجموعة المرضى	مجموعة السيطرة
39-20	%20(6)	%30(3)
59-40	%53.33(16)	%50(5)
< 60	%26.66(8)	%20(2)
المجموع	%100(30)	%100(10)
P value	0.911	

أظهرت النتائج أن الإصابة بأمراض المعدة والأمعاء تكون منخفضة في الفئة العمرية 20 – 39 سنة وتزداد في الفئة العمرية 40 – 59 سنة). وجاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع النتائج التي أجراها الباحثون Nasserolahei وآخرون (2014) و Helaly (2009). إذ أن الاتجاه الملاحظ في الجدول أعلاه والخاص بزيادة نسبة الأمراض مع تقدم العمر غير مرتبط مع التوزيع الديموغرافي للسكان لكون الفئة العمرية 20-39 هي الأعلى في المجتمع وهذا يدل على أن زيادة نسبة الأمراض للدراسة الحالية في الفئة العمرية 40-59 مرتبط مع العوامل المسببة لأمراض المعدة والأمعاء والتي تكون في مقدمتها الإصابة ببكتريا *H.pylori* التي تكون مكتسبة خلال فترة الطفولة ولكن مظاهر المرض عادة لا تظهر حتى بعد تقدم العمر بعد فترات طويلة من الكمون (Latency) (Tanih وآخرون ، 2008).

واظهرت دراسة سابقة أن معدل الإصابة ببكتريا *H.pylori* كان أعلى في مرحلة الطفولة وقد يعود ذلك لكون الناس عادة يصابون بهذه البكتريا خلال هذه المرحلة العمرية وعادة تكون بعد فترات طويلة من الكمون (Latency) (Pounder ، 2009). وكذلك اظهرت نتائج الدراسة الحالية انخفاض الإصابة بهذه البكتريا عند كبار السن والذي تزيد أعمارهم عن 60 عام وهناك نظريتين لتفسير ذلك إما أن تكون البكتريا موجودة في أعداد قليلة أو تكون ذات نشاط منخفض ولا يتم الكشف عنها أو أن تكون البكتريا موجودة مسبقاً وتم القضاء عليها نتيجة تطور بيئة غير ملائمة في المعدة نتيجة تقدم العمر (Yamaoka وآخرون ، 2006).

4- 4 الاختبارات التشخيصية المستخدمة للكشف عن الاصابة ببكتريا *H. pylori*

4-4-1 اختبار اليوريز السريع للخزعة النسيجية (Rapid urease test for biopsy)

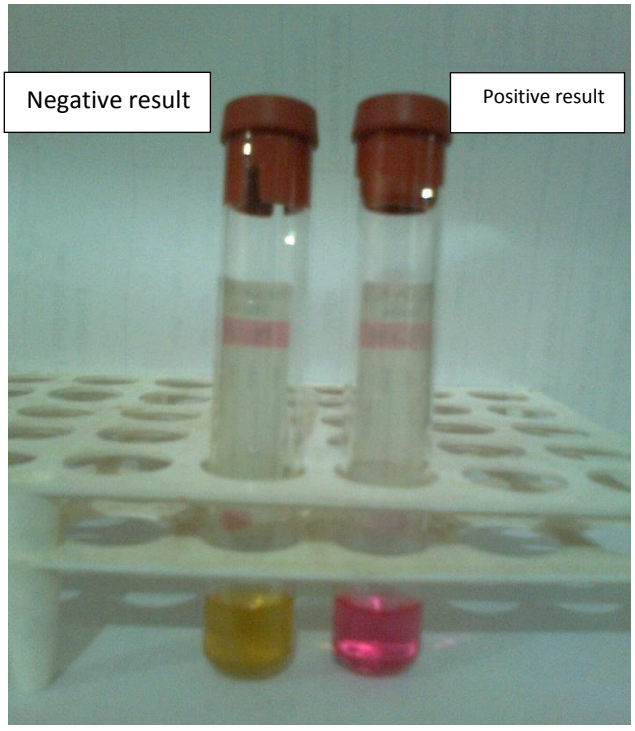
اظهرت 13 (43.33%) خزعة نسيجية نتيجة ايجابية لاختبار اليوريز السريع من بين 30 خزعة نسيجية لمجموعة المرضى وبالمقابل 17 (56.67%) خزعة نسيجية اعطت نتيجة سلبية لهذا الاختبار في حين خزعة نسيجية واحدة فقط في مجموعة السيطرة أظهرت نتيجة ايجابية 1(10%) و9 (90%) خزعات نسيجية اظهرت نتيجة سلبية لقد وجد في هذه الدراسة فرق معنوي ذو دلالة احصائية عالية إذ أن (P value) تساوي (0. 01) بين مجموعتي الدراسة وكما موضح في الجدول (4-4) .

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

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

اظهرت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة الموجبة لاختبار اليوريز السريع (RUT) 43.33% من مجموعة المرضى والبالغ عددهم (30) ، حيث كانت مقاربة للنتائج التي حصل عليها Al-Sulami وآخرون (2013) التي اظهرت نسبة المرضى الموجبة لاختبار اليوريز السريع 42% من مجموعة

المرضى والبالغ عددهم(112) ، وكذلك تتوافق مع النتائج التي حصل عليها Al-Jumaily (2013) التي اظهرت نسبة نسبة المرضى الموجبة لاختبار اليوريز السريع 44.56% من مجموعة المرضى والبالغ عددهم (92) إذ إن اختبار اليوريز السريع يعتمد أساسا على عدد الخلايا البكتيرية في الخزعات وأن أكثر من خزعة واحدة قد يعطي نتائج اختبار سريعة للغاية كما أن حجم الخزعة في حد ذاته قد يحدد عدد الخلايا البكتيرية داخل هذه الخزعات الشكل (4–1). ولقد اشارت الدراسات إلى أن عدد المستعمرات الموجودة في الخزعات و اللازمة لإعطاء نتائج ايجابية لفحص اليوريز السريع يجب أن لا تقل عن 10^4 مستعمرة لكل خزعة (Marshall وآخرون ، 1987). كما أن التوزيع البقعي Patchy (distribution) لهذه البكتريا داخل بطانة المعدة له دور في نسبة الكشف عنها بواسطة هذا الاختبار (Dandin وآخرون ، 2012) .في حين بين Thomas وآخرون (2012) أن النسبة الموجبة المنخفضة لاختبار اليوريز السريع تعزى الى مثبطات مضخة البروتانات Proton Pump Inhibitor (PPIs) التي تؤخذ من قبل المرضى والتي تثبط حيوية هذه البكتريا وبالتالي تؤثر على نسبة تشخيصها وكذلك وجودها بالشكل المكور (coccoid) الذي يؤثر على فعالية هذه البكتريا وإنتاجها لأنزيم اليوريز أقل مّما علية في حال وجودها بالشكل الحلزوني (Spiral) ، لذلك يكون من الصعب تشخيص هذه البكتريا باختبار اليوريز السريع وهي بالشكل المكور (Andersen و Rasmussen ، 2009).



شكل (4–1) النتائج الموجبة والسالبة لاختبار اليوريز السريع في وسط اليوريا السائل

ومن جهةٍ أُخرى أشار الباحثون إلى عدم اعتبار فحص اليوريز السريع الاختبار التشخيصي الوحيد للكشف عن بكتيريا *H. pylori* في حالات امراض المعدة بسبب ظهور النتائج السلبية الكاذبة، كما هو الحال في الدراسة التي اجراها Eleftheria وآخرون (2010) الذي أُجريت الكشف عن 530 طفلا مصاب ببكتريا *H. pylori* حيث اعطى 442 طفلا منهم نتائج ايجابية لاختبار اليوريز السريع ؛ لذلك يجب أن يتم جمع هذا الاختبار مع الاختبارات القياسية الأخرى للحصول على نتائج مثالية والتي تشمل (الكشف عن بكتريا *H.pylori* في الخزعة النسيجية عن طريق الجين (16S rDNA) بوسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR ، اختبار التحري عن الجسم المضاد (IgG) الخاص بهذه البكتريا Rapid anti *H. pylori* test أو اختبار الزرع البكتيري Bacterial culture).

2-4-4 التحري عن الاجسام المضادة الخاصة بالبكتريا الحلزونية Anti-*H.pylori* IgG

في الدراسة الحالية كانت النتائج الإيجابية التحري عن الأجسام المضادة (IgG) الخاص ببكتريا *H. pylori* في عينات مصل الدم المأخوذة من مجموعة المرضى بنسبة 56.67% (17عينة). والنتائج السلبية بنسبة 43.33%(13عينة) أما مجموعة السيطرة فكانت النتائج الإيجابية بنسبة 30% (3عينات) والنتائج السلبية بنسبة 70%(7عينات)، لقد وجد في هذه الدراسة فرق معنوي ذو دلالة احصائية إذ أن (P value) تساوي (0. 05) وكما موضح في الجدول (4–5)

جدول (4-5) التحري عن الأجسام المضادة الخاصة بالبكتريا الحلزونية Anti-*H.pylori* IgG

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

وجد في هذا الاختبار أشخاص ضمن مجموعة السيطرة اعطوا نتائج ايجابية لاختبار التحري عن الأجسام المضادة (IgG) الخاص ببكتريا *H. pylori* ويمكن أن تُعزى تلك النتائج الايجابية ألى بقاء مستوى الأجسام المضادة من النوع (IgG) لعدة شهور بعد الشفاء من الإصابة (Goldsby وآخرون ، 2000). ومن جهةٍ أُخرى يمكن ان تعود النتائج السلبية لهذا بين مجموعة المرضى إلى ضعف الاستجابة المناعية لديهم (Oluwasola و Ogunbiyi ، 2004). وتتفق هذه النتائج مع النتائج التي حصل عليها Al-Jumaily (2013) و Ebrahem (2014) وتختلف عن النتائج التي حصل عليها

Alazmiوآخرون (2010) إذ بينوا أن النتائج الإيجابية لهذا الاختبار 85%في مجموعة المرضى وفي 10% مجموعة السيطرة ، إن الاختلافات في نسبة تشخيص هذه البكتريا عن طريق التحري عن الاجسام المضادة الخاصة بالبكتريا الحلزونية Anti-*H.pylori* IgG في مصل الدم قد تعود إلى حجم العينات المستخدمة في الدراسة ، وعلى الحالات المرضية المختلفة وكذلك على مدة الحضانة للمريض، لإن الاجسام المضادة لا تنتج في بداية الاصابة بل تحتاج الى فترة زمنية إذ أن معظم المرضى المصابين بهذه البكتريا تتولد لديهم استجابة مناعية ضد المستضد الذي يغطي سطح واسواط هذه البكتريا وفي معظم الحالات يمكن الكشف عن هذه الاستجابة المناعية في مصل الدم ، لذلك يكون هذه الاختبار مفيد في تشخيص الإصابة ببكتريا *H. pylori* وغير مفيد في متابعة نتائج العلاج (Hassan ، 2011).

3-4-4 اختبار الاستنبات البكتيري Bacteriology Culture Test

اعطت ثلاث(3) خزعات نسيجية نتيجة ايجابية في اختبار الاستنبات البكتيري من بين 30 خزعة نسيجية لمجموعة المرضى وبنسبة 10% وكانت نسبة العينات السالبة للاستنبات 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 معنوي ذو دلالة احصائية عالية ($P>0.05$) بين مجموعتي الدراسة وكما موضح في الجدول (4–6)

جدول رقم (4-6) نتائج اختبار الاستنبات البكتيري للخزعة النسيجية بين مجموعتي الدراسة

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

وشخصت المستعمرات على أنها بكتريا *H.Pylori* وذلك اعتمادا على شكل المستعمرات، والتصبيغ بملون غرام (Gram stain) ،أختبار أنظيم اليوريز، واختبار أنزيم الكاتاليز و انزيم الاوكسديز، بعد زرع العينات على وسط السكيروز الانتقائي المحور(Modified Selective Skirrows Medium) ولفترة حضانة 7–14 يوما في ظروف ملائمة لتنمية هذه البكتريا تكون قليلة الأوكسجين باستخدام عدة توليد الغاز (Gas generation kit) حيث تم الحصول على ثلاث عزلات لهذه البكتريا، و بين الفحص المجهري لمسحات محضرة من المزروع البكتيري الصلب لهذه البكتريا باستخدام صبغة غرام على أنها خلايا حلزونية أو عصوية تظهر بشكل جناح النورس طولها 1–3 مايكرون وعرضها 0.5 مايكرون وظهرت سالبة لصبغة كرام وتظهر العزلات البكتيرية على شكل

مستعمرات صغيرة جدا محدبة دائرية منتظمة الحواف 1–3 مايكرون وشفافة مشابهة لقطرات الماء أو رمادية (Versalovic، 2003).

تبين في هذه الدراسة أن اختبار الزرع الاستنبات جاء بأقل نسبة مقارنةً بالفحوصات الأُخرى المستخدمة في هذه الدراسة و ربما يعود ذلك ألى 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 (Thomas وآخرون ، 2012). أو بسبب بعض العوامل الأخرى مثل التوزيع البقعي (Patchy distribution) لهذه البكتريا داخل بطانة المعدة والسحق غير ملائم للخزعة النسيجية (Iinadequate mincing of the Biopsy) ، وجود النبيت الطبيعي (Flora) في الفم والبلعوم الذي ينافس هذه البكتريا في الخزعة النسيجية ويؤثر على نموها أو فقدان حيوية النموذج خلال عملية النقل أو ابتلاع مخدر الزايلوكاين (Xylocaine) قبل إجراء فحص الناظور (Kaore وآخرون ، 2012). وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع النتائج التي حصل عليها Kaore وآخرون (2012) وكانت نسبة العزل لديهم9.69% وتقترب من النتائج التي حصل عليها Al-jumaiy (2013) و رديف (2011) التي كانت نسبة العزل لديهم 7.31% و 5% على التوالي

4-4-4 الكشف عن بكتريا *H.pylori* في الخزعة النسيجية عن طريق الجين (16S rDNA) بوسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

تم الكشف الجزيئي عن بكتريا *H. pylori* في هذه الدراسة من خلال الكشف عن الجين (16S rDNA) الخاص بها بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR بعد استخلاص الدنا من الخزعة النسيجية وقياس نقاوته بمطياف القطرة النانوية (Nanodrop Spectrophotometer) حيث اظهرت النتائج أن تراكيز الدنا تتراوح بين 62–100 نانو كرام لكل مايكرو ليتر وقد يعتمد ذلك على حجم الخزعة النسيجية المأخوذة، وكانت النقاوة تتراوح بين 1.78– 1.83 وذلك بالاعتماد على الامتصاصية 260/280 ،كما موضح في جدول (4–7)

جدول(4-7) قياس تركيز ونقاوة الدنا باستخدام مطياف القطرة النانوية

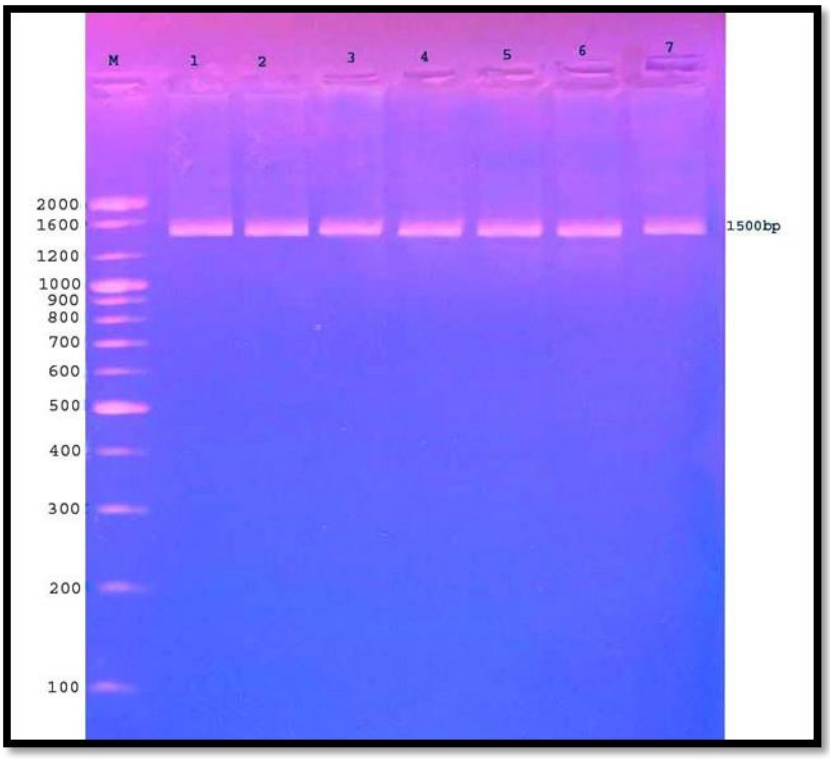
تركيز ألـ DNA(ng/ µL)	النقاوة260/280
62.7	1.83
71.7	1.80
68.4	1.79
98	1.81

1.80	88.6
1.78	100

في هذه الدراسة تم الكشف عن الجين (16S rDNA) الخاص لبكتريا *H.pylori* والذي يكون على شكل حزم بحجم 1500 زوج قاعدي الشكل (4-2). بنسبة 80%(24 من 30 عينة) في مجموعة المرضى وبنسبة 10%(1من 10 عينات) في مجموعة السيطرة لقد وجد في هذه الدراسة فرق معنوي ذو دلالة إحصائية عالية بين مجموعتي الدراسة إذ أن (P value) تساوي (0. 001) وكما موضح في الجدول رقم (4-8) .

جدول (4-8) نسبة موجبيه الكشف عن الجين (16S rDNA) **لمجموعتي الدراسة.**

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



الشكل(4-2) الكشف عن ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR بواسطة الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز 1% عند فولتية 80 فولت/سم ولمدة 60 دقيقة لحزم الدنا الخاصة بالجين (16S rDNA) لبكتريا *H.pylori*، حيث M

يمثل حجم الدنا القياسي (100-2000bp)، و من (1–7) تمثل ايجابية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR والتي تظهر منتوج بحجم 1500bp.

إن نتائج الدراسة الحالية جاءت متوافقة مع نتائج الدراسة التي اجراها الباحثان Jabbar (20015) و Johannessen وآخرون (2013) . وتختلف نتائج الدراسة الحالية عن النتائج التي حصل عليه Ali (2013) والذي تمكن من تشخيص الجين (16S rDNAوالذي يكون بحجم 1500bp) الخاص ببكتريا *H. pylori* بنسبة 100% في الخزعات النسيجية المأخوذة من المرضى المصابين بالأمراض المعدية. وكذلك وتختلف نتائج الدراسة الحالية عن النتائج التي حصل عليها الباحثون Khalaf وآخرون (2015) والذي تمكنوا من تشخيص الجين 16S rDNA الخاص ببكتريا *H. pylori* في الخزعات النسيجية المأخوذة من المرضى المصابين بالأمراض المعدية وبنسبة99%. ويعتبر الكشف عن الجين (16S rDNA) من الطرق واسعة الاستخدام للكشف عن بكتريا *H.pylori* في النماذج السريرية المأخوذة من المرضى (Espinoza وآخرون ، 2011). تعتبر طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR طريقة حساسة جداً للكشف عن مسببات الأمراض مثل بكتريا *H.pylori* (Abu-Almaali وآخرون ، 2012). لكن التغيرات في تتابعات النيكليوتيدات لنفس الجينات بين سلالات مختلفة تابعة لنفس الجنس والنوع للكائن ربما تؤثر على معنوية النتائج ، حيث أن التغيرات في تتابع النيكليوتيدات يمكن أن تحدث في موقع ارتباط البادئ لذلك تؤدي الى تثبيط تفاعل PCR واعطاء نتيجة سلبية كاذبة (False negative) ، او تؤدي الى تقليل كمية ناتج التفاعل ولذلك تختلف نسبة ايجابية الكشف الجين (16S rDNA) الخاص ببكتريا *H. pylori* في الخزعات النسيجية من باحث لأخر (Mamoun وآخرون ، 2015) لقد استخدمت البادئات (Primers) للجين (16S rDNA) للكشف عن بكتريا *H.pylori* في العديد من البحوث. هذه البادئات (Primers) تعتبر كعلامات حيوية (Biomarker) لوجود بكتريا *H.pylori* . وهي احدى الاهداف الخاصة لتأكيد الاصابة بهذه البكتريا، وان عملية تضخيم (Amplification) قطع خاصة من الحامض النووي (DNA) الخاص ببكتريا *H.pylori* يمكن أن يُعتبر كدليل واضح لوجود هذه لبكتريا (Smith وآخرون ، 2004). وأن تضخيم قطع خاصة من هذا الجين تستخدم في تشخيص البكتريا بسبب وجود نسخ عديدة من (rRNA) مثل 5SrRNA ، 16 SrRNA و 23SrRNA ، لكل خلية بكتيرية والتي تزيد من نسخ الحامض النووي الهدف (DNA target) الآف المرات .لذلك تضخيم هذه الجين يمكن أن يعطي نتائج ايجابية في العديد من الحالات(Lim وآخرون ، 2003)

5-4 تأثير العلاجات في تشخيص بكتريا *H.pylori* و تحديد نسبة انتشارها في مجموعة المرضى

1-5-4 المقارنة بين نتائج اختبارات الاستنبات البكتيري و تفاعل البلمرة المتسلسل PCR بالنسبة لمجموعة المرضى مع او بدون اخذ العلاجات السابقة

في الدراسة الحالية كانت ايجابية الاستنبات البكتيري لبكتريا *H.pylori* 37%(3) للعينات المأخوذة من المرضى الذين لا يستخدمون علاجات(مضادات حيوية ومثبطات مضخة البروتونات) والبالغ عددهم 8، وبنسبة 0% بالنسبة للمرضى الذين يستخدمون علاجات والبالغ عددهم 22. في حين كان الكشف عن هذه البكتريا ألـ PCR في المرضى غير المستخدمين للعلاجات والبالغ عددهم 8 بنسبة 87.5 % (7) وبنسبة 77.2%(17) بالنسبة للمرضى الذين يستخدمون علاجات والبالغ عددهم 22. لقد وجد في هذه الدراسة فرق معنوي ذو دلالة احصائية عالية بين مجموعتي المرضى المستخدمين وغير المستخدمين للعلاجات إذ أن (P value) تساوي (0. 01) وكما موضح في جدول (4–9).

جدول (4–9) تأثير اخذ العلاجات على كفاءة التشخيص باستخدام الاستنبات البكتيري وألـ PCR.

مجاميع المرضى	العدد	ايجابية الاستنبات البكتيري	ايجابية الكشف بواسطة PCR
اخذ علاجات سابق	22	%0 (0)	77.2 (17) %
دون اخذ علاجات سابقة	8	%37.5 (3)	%87.5 (7)
المجموع	30	%10 (3)	%80 (24)
P value	0.01		

بينت نتائج هذه الدراسة أن أغلب المرضى المحالين إلى وحدة الناظور سبق لهم وان تناولوا علاجات التهابات المعدة التي تشمل المضادات الحيوية والعقاقير المثبطة لمضخة البروتون Proton pump inhibitor (PPIs) وهذا يؤدي الى عدم استنبات بكتريا *H. pylori* من الخزعات المأخوذة من المرضى المصابين بهذه البكتريا، حيث أن هذه العلاجات تثبط حيوية هذه البكتريا وتحولها من الشكل الحلزوني الى الشكل الكروي وبذلك يصعب تنميتها (Thomas وآخرون ، 2012). وهذا يقلل من أهمية الزرع البكتيري كوسيلة تشخيصية للبكتريا محليا ويرفع من قيمة استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل للكشف عن بكتريا *H. pylori* مباشرة من الخزعة النسيجية لتجاوز تأثير العلاجات على طريقة الاستنبات البكتيري إذ أن تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR يمكن ان تكشف عن جينوم هذه البكتريا ولم تُظهر هذه العلاجات تأثير واضح على إيجابية الشخيص.

4-5-2 نسبة انتشار بكتريا *H. pylori* في مجموعة المرضى Percentage of *H.pylori* in Distribution patient group

في الدراسة الحالية كانت أعلى نسبة لتشخيص الإصابة ببكتريا *H.pylori* بين المرضى كانت عن طريق الكشف عن بكتريا *H.pylori* في الخزعة النسيجية بوسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وكانت نسبته 80% ويليه اختبار التحري عن الجسم المضاد (IgG) الخاص بهذه البكتريا(Rapid anti *H. pylori* test) وبنسبة 56.67 ومن ثم اختبار اليوريز السريع للخزعة النسيجية(Rapid urease test)الذي كانت نسبته 43.33% أما الاستنبات البكتيري (Culture) جاءت بأقل نسبة بين الفحوصات الاربعة حيث كانت 10% كما موضح في جدول (4-10).

جدول (4-10)الاختبارات التشخيصية المستخدمة للكشف عن بكتريا *H. pylori*

اسم الاختبار	الحالات الايجابية	الحالات السلبية	المجموع
تفاعل البلمرة المتسلسلPCR	%80 (24)	%20 (6)	%100 (30)
الكشف عن الأجسام المضادة IgG	%56.7(17)	%43.3(13)	%100 (30)
اليوريز السريع	%43.3(13)	%56.7(17)	%100 (30)
الاستنبات البكتيري	%10(3)	%90 (27)	%100 (30)

إن الاعتماد على اختبار واحد يزيد نسبة الخطأ في تشخيص الإصابة لذلك يوصى باستخدام اختبارين او أكثر لتشخيص الإصابة بشكل أدق (Espinoza وآخرون 2011 ؛ Lee وآخرون ، 2012). وفي الدراسة الحالية استخدمنا اربعة اختبارات مختلفة لتشخيص الإصابة ببكتريا *H.pylori* وكما موضح في جدول (4-8). يعتبر الشخص مصابا ببكتريا *H. pylori* اذا كانت لنتائج الاختبارات ايجابية في اثنين من الاختبارات الثلاثة التالية (اختبار الاستنبات البكتيري Bacterial Culture test، اختبار التحري عن الاجسام المضادة (IgG) الخاصة ببكتريا *H.pylori* (Rapid anti *H. pylori* test)، واختبار اليوريز السريع للخزعة النسيجية (Rapid urease test) (Al Jumaily ، 2013). وبالاعتماد على نتائج اثنين من هذه الثلاثة اختبارات في التشخيص تظهر نتائج الدراسة الحالية أن نسبة انتشار الإصابة ببكتريا *H.pylori* بين المرضى (50%) وهذه النتائج تتفق مع النتائج التي حصل عليها الربيعي (2006) الذي بين في دراسته أن نسبة انتشار الإصابة بهذه البكتريا 48.23% بين المرضى العراقيين , بينما لا تتفق مع النتائج التي حصل عليها الهادي (2001) والذي بين أن نسبة

انشار هذه البكتريا هو 74.1% . وكذلك يعتبر الشخص مصابا ببكتريا *H.pylori* اذا تم الكشف عن الجين 16S rDNA الخاص بها في الخزعة النسيجية بوسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (Abu-Almaali وآخـرون ، 2012 ؛ Ali ، 2013 ؛ Khalaf وآخـرون 2015). و بالاعتمـاد علـى ذلـك كانـت نسـبة الإصابة ببكتريا *H.pylori* بين المرضى هي 80%. نتائج الدراسة الحالية جاءت متوافقة مع النتائج التي اجراها الباحث Jabbar (2015) و إذ تمكن من تشخيص الجين 16S rDNA لبكتريا *H.pylori* بنسبة80 % ولا تتوافق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج الدراسة التي اجراها Ali (2013) الذي تمكن من تشخيص الجين 16S rDNA لبكتريا *H.pylori* في الخزعة النسيجية بوسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR بنسبة 100% بين مجموعة المرضى المصابين بالأمراض المعوية. إن الاختلاف في نسبة انتشار الإصابة ببكتريا *H.pylori* بين الأمراض المعدية قد يعود إلى طرق التشخيص المعتمدة في الكشف عن هذه البكتريا حيث لكل طريقة خصوصية وحساسية خاصة بها، وفي الدراسة الحالية تفوقت طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لتشخيص هذه البكتريا عن الطرق الأخرى حيث تم الكشف عن الحمض النووي لهذه البكتريا بنسبة (80%) بين مجموعة المرضى وتتميز هذه الطريقة بإمكانية الكشف عن الحمض النووي الخاص بهذه البكتريا في الخزعات النسيجية المأخوذة من المعدة حتى لو كان في كميات ضئيلة جداً، وكذلك تعتمد نسبة انتشار هذه البكتريا على حجم العينة الداخلة في الدراسة، المنطقة الجغرافية التي تم جمع العينات منها، (Al-Dhaher ، 2001 ؛ Hussein ، 2012 ؛ Ebrahim ، 2014).

في الدراسة الحالية كان نسبة انشار بكتريا *H.pylori* 80% بالاعتماد على التشخيص بواسطة PCR و 50% بالاعتماد علـى ننتـائج اثـنين مـن الاختبـارات التشخيصـية التاليـة (اختبـار الاسـتنبات البكتيري Bacterial Culture test، اختبار التحري عن الاجسام المضادة (IgG) ببكتريا *H.pylori* (Anti *H. pylori* IgG test)، واختبار اليوريز السريع للخزعة النسيجية (Rapid urease test). حيث تكون نسبة انتشار بكتريا *H.pylori* مختلفة بين البلدان، وبصورة عامة نسبة انتشارها 30% في البلدان المتطورة و 80% في البلدان النامية (Kusters وآخـرون ، 2006) وتزداد نسبة اتشارها في البلدان المجاورة من العراق مثل تركيا وايران حيث سجلت نسبة انتشارها 90% في تركيا و 84.4% في ايران (Salih وآخرون ، 2010 ؛ Karagar وآخرون ، 2011).

6-4 تحديد جينات الضراوة للبكتريا الحلزونية بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسلPCR

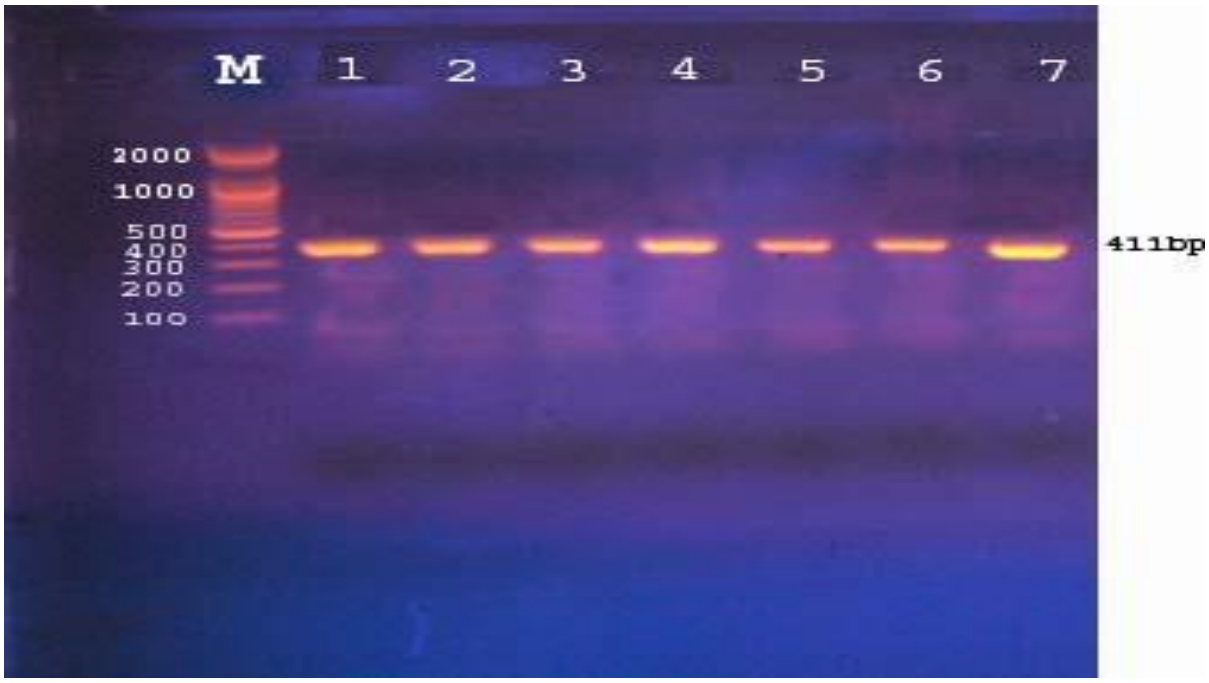
Determination of *Helicobacter pylori* Virulence Genes by PCR

جينات الضراوة	النتائج الايجابية	النتائج السلبية	المجموع

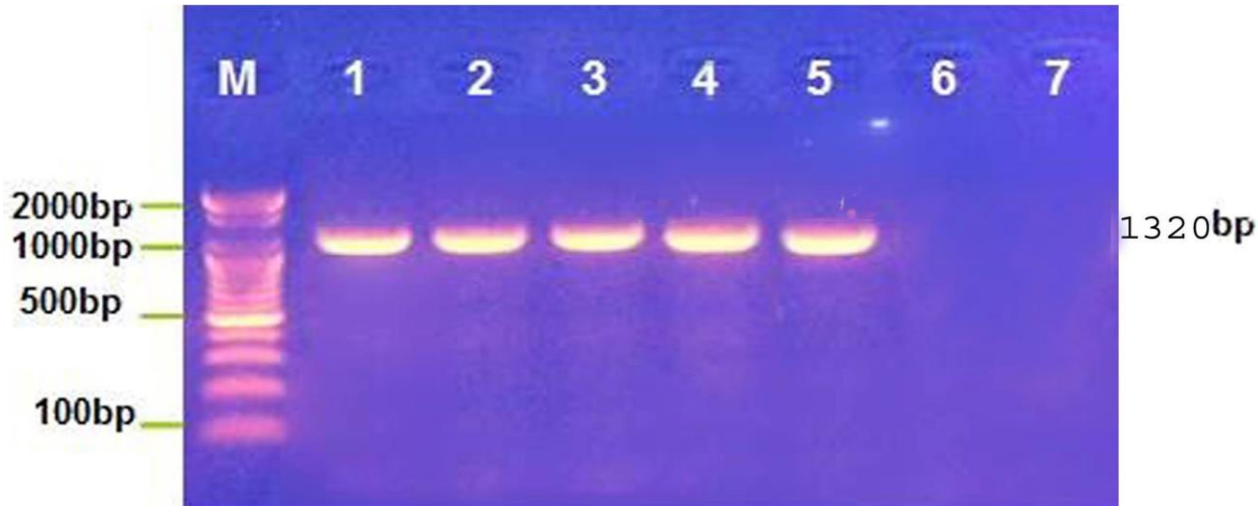
ureA	%91.66(22)	%34(.28)	%100(24)
cagA	%66.66(16)	%33.34(8)	%100(24)
vacA	%45.83 (11)	%54.17(13)	%100(24)

تم الكشف عن جينات الضراوة لبكتريا *H.pylori* في جميع عينات المرضى التي كانت نتائجهم ايجابية في الكشف التشخيصي باستخدام الجين 16S rDNA والبالغ عددهم 24 من 30 حالة والتي شكلت نسبة 80% من المرضى المشمولين بالدراسة. وبالاعتماد على ذلك تم تحديد جينات الضراوة لبكتريا *H.pylori* في الخزعات النسيجية الحاوية على هذه البكتريا، حيث تم الكشف عن الجين *ureA* والذي يشفر للوحدة الثانوية من انزيم اليوريز وهو من اهم عوامل الضراوة لهذه البكتريا والذي يبلغ حجمه 411 bp الشكل (4-3)، حيث تم تحيد هذا الجين في 22 حالة من المرضى المصابين بهذه البكتريا والبالغ عددهم 24 أي بنسبة 91.66%. أما الجين *cagA* والذي يكون بحجم1320bp الشكل (4-4) الذي يشفر للذيفان الخلوي فتم الكشف عنه في 16 حالة مرضية من اصل24 من المرضى المصابين ببكتريا *H.pylori* وبنسبة 66.66%، وتم الكشف الجين *vacA* والذي يكون بحجم 678bp الشكل (4-5) في 11 خزعة نسيجية من اصل 24 أي بنسبة 45.83% من الخزعات النسيجية الحاوية على بكتريا *H.pylori* وكما موضح في جدول (4-11).

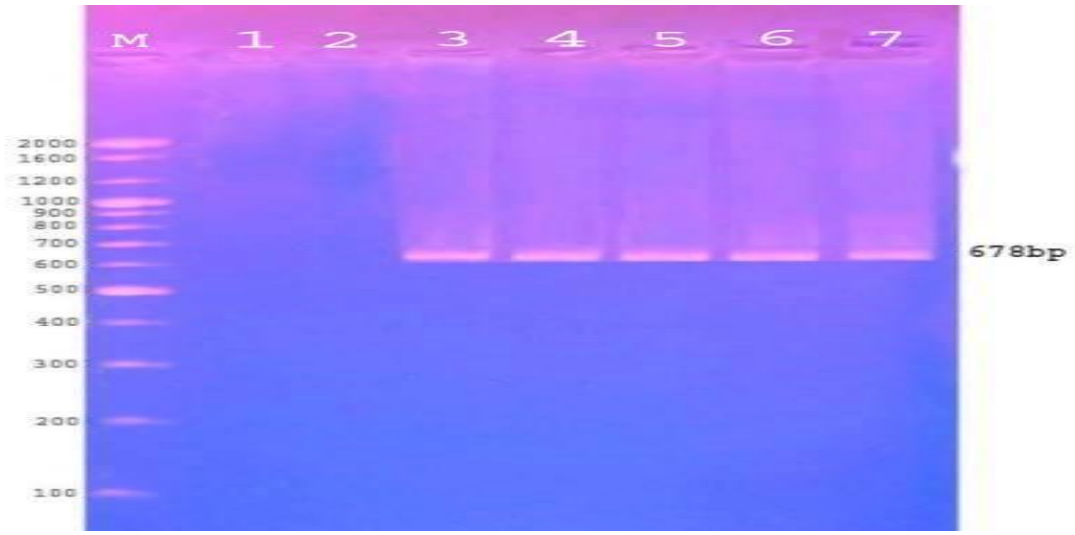
جدول (4-11) الكشف عن جينات الضراوة لبكتريا *H.pylori* بواسطة ألـ PCR



شكل(4-3) الكشف عن ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR بواسطة الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز 1% لحزم عند فولتية 80 فولت/سم ولمدة 60 دقيقة الجين *ureA*، حيث (M) يمثل حجم الدنا القياسي 100-2000bp، (7-1) تمثل حزم الدنا للجين *ureA* والذي يظهر بحجم 411bp



شكل(4-4) الكشف عن ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR بواسطة الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز 1% عند فولتية 80 فولت/سم ولمدة 60 دقيقة لحزم الجين *cag*A، حيث (M) يمثل حجم الدنا القياسي 100-2000bp، (5-1) تمثل حزم الدنا للجين *cag*A والذي يظهر بحجم 1320bp



شكل (4-5) الكشف عن ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR بواسطة الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز 1% لحزم عند فولتية 80 فولت/سم ولمدة 60 دقيقة الجين *vacA*، حيث (M) يمثل حجم الدنا القياسي 100-2000bp، (7-3) تمثل حزم الدنا للجين *vacA* والذي يظهر بحجم 678bp

في الدراسة الحالية كانت نسبة الكشف عن الجين *ureA* هي 91.66% في الخزعات النسيجية الحاوية على بكتريا *H.pylori* ، وأن وجود هذا الجين بنسب مرتفعة ربما يعود إلى دوره الأساسي في تحمل بكتريا *H.pylori* للبيئة الحامضية الموجودة داخل تجويف المعدة، حيث يعتبر هذا الجين من جينات الضراوة المهمة لهذه البكتريا والذي يكون مسؤول عن انتاج الوحدة الثانوية الداخلة في تركيب انزيم اليوريز الذي يحلل اليوريا في المعدة ويحولها الى امونيا وبذلك يعادل البيئة الحامضية لتجويف المعدة ويمكن بكتريا *H.pylori* من البقاء في هذه البيئة القاسية (Sachs ، 2000). وهذه تتوافق مع دراسة Essawi و (2013) إذ تمكنوا من الكشف عن هذا الجين في الخزعات النسيجية الحاوية على بكتريا *H.pylori* بنسبة 92% وفي دراسة أخرى أجراها Módena وآخرون (2007) ارتفعت نسبة الكشف عن هذا الجين في الخزعات النسيجية الحاوية على بكتريا *H.pylori* لتصل إلى 100%. أن معظم سلالات بكتريا *H.pylori* تحتوي على الجين *ureA* ويكون ذو حساسية وخصوصية تزيد عن 90%، لذلك يمكن أن يستخدم في تشخيص هذه البكتريا (Sugimoto وآخرون ، 2009).

وكانت نسبة الكشف عن الجين *cagA* في الخزعات النسيجية الحاوية على بكتريا *H.pylori* هي 66.66% ، وهذه تتوافق مع النتائج التي حصل عليها Jabbar و Al-obaidi (2015) و Thair (2010) تختلف نسبة انتشار سلالات بكتريا *H.pylori* الموجبة لعامل الضراوة *CagA* ففي الدراسة أجراها Ernst وآخرون(1995) بين أن نسبة انتشارها تكون منخفضة 41%. وفي دراسة أخرى اجراها Vaira وآخرون(2006) بين أن نسبة انتشارها تكون مرتفعة وقد تصل إلى 100%. في حين معظم الدراسات الأُخرى اشارت إلى أن نسبة انتشارها تتراوح ما بين 74.35% إلى 91% (Steven وآخرون ، 2001). و يُعتقد أن حجم العينة يجب أن يكون كبير حتى يعطي نسبة حقيقية لانتشار سلالات بكتريا

H.pylori الموجبة لعامل الضراوة *CagA* وهناك عوامل أُخرى ممكن أن تؤثر على نسبة انتشار هذه السلالات وتشمل عوامل جغرافية وعوامل بيئية وعوامل اجتماعية واقتصادية (Hussein ، 2012). وكذلك يعتمد تحديد انتشار سلالات بكتريا *H.pylori* الموجبة لعامل الضراوة *CagA* على الحالات المرضية المختلفة الداخلة في الدراسة ، إذ ترتفع في بعض الحالات المرضية مثل سرطان المعدة لتصل الى (100%)، وتنخفض في بعض الحالات المرضية مثل التهاب المعدة المزمن لتصل ألي 50% (Mohammed و Abdullah ، 2013).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة الكشف عن الجين *vacA* هي 45.83% في الخزعات النسيجية الحاوية على بكتريا *H.pylori* ، وهذه تتوافق مع النتائج التي حصل عليها Falsafi وآخرون (2015) و Essawi وآخرون(2013). وتنخفض نتائج نسبة الكشف عن هذا الجين الدراسة الحالية عن النتائج التي توصل لها Qiang وآخرون (2002) حيث حددوا هذا الجين بنسبة 100% في الخزعات النسيجية الحاوية على بكتريا *H.pylori* ، وتفوق نسبة الكشف عن هذا الجين في الدراسة الحالية عن النتائج التي توصل لها Módena وآخرون (2007) حيث وجدوا هذا الجين بنسبة (18%) في الخزعات النسيجية الحاوية على بكتريا *H.pylori* . تعود نسبة اختلاف هذا الجين إلى الحالات المرضية الداخلة في الدراسة قد يعود الى فعالية هذا الجين الذي يعمل على تكوين حويصلات حامضية (Acidic vacuoles) في سيتوبلازم خلايا المعدة الظهارية (Gastric epithelial cells) وذلك عن طريق أحداث ثقوب في اغشية الخلايا الظهارية والتي تسمح بتحرير الأيونات سالبة الشحنة(Anions) واليوريا و كذلك يعمل ناتج الجين على تفكك الروابط المحكمة للبطانة الظهارية وبالتالي تسمح للمغذيات من المرور خلال الحاجز المخاطي (Mucosal barrier) ومن ثم إلى بكتريا *H.pylori* وهذا يؤدي إلى احداث امراض معوية مختلفة (Yamaoka وآخرون ، 2006)

7-4 الكشف عن جينات الضراوة لبكتريا *H.pylori* في الحالات المرضية المختلفة

في الدراسة الحالية كانت نسبة الكشف عن الجين *ureA* 100% لكل من حالات سرطان المعدة و قرحة المعدة وقرحة الاثني عشر، أما في حالات في حالات التهاب المعدة المزمن فكانت 90% ، و 50% في مرض الارتجاع المعدة المريء. اما نسبة الكشف عن الجين *cagA* فكانت 100% لكل من حالات سرطان المعدة وقرحة المعدة، 83.33% في قرحة الأثني عشر، 50% في التهاب المعدة المزمن، و 0% في مرض الارتجاع المعدة المريء. في حين كانت نسبة الكشف عن الجين *vacA* هي 60% في التهاب المعدة المزمن، 50% لكل من حالات قرحة المعدة و قرحة الاثني عشر، و بنسبة 0% لكل من حالات سرطان المعدة الارتجاع المريء المعدة. ونسبة التداخل بين جينين كان 79.1% والتداخل بين الجينات الثلاث كان 12.5%وكما موضح في جدول (4-12).

جدول (4-12) الكشف عن جينات الضراوة لبكتريا*H.pylori* في الحالات المرضية المختلفة

الحالات المرضية	*ureA*	*cagA*	*vacA*	تداخل جينين	تداخل 3جينات
سرطان المعدة	%100 (2)	%100 (2)	%0 (0)	%100 (2)	0
قرحة المعدة	%100 (4)	%100 (4)	%50 (2)	%100 (4)	%25 (1)
قرحة الاثني عشر	%100 (6)	%83.33 (5)	%50 (3)	%83.33 (5)	33.33 (2)
التهاب المعدة المزمن	%90 (9)	%50 (5)	%60 (6)	%80 (8)	0
مرض الارتجاع	%50 (1)	0	0	0	0
العدد الكلي	.91.66%(22)	%66.6 (16)	%48 (11)	% 79.1(19)	%12.5(3)

اظهرت نتائج الدراسة الحالية إن أعلى نسبة للكشف عن الجين *ureA* كانت في حالات سرطان المعدة وقرحة المعدة وقرحة الاثني عشر حيث سجلت 100% لكل منهما ثم يليها التهاب المعدة المزمن وبنسبة 90% وأقل نسبة للكشف عن هذا الجين كانت في مرض ارتجاع المعدة المريء حيث سجلت 50%. تتفق نتائج الدراسة الحالية مع النتائج التي حصل عليها الباحثونKumar وآخرون (2010) وتعود نسبة الكشف المرتفعة لهذا الجين بين الحالات المرضية المذكورة إلى الدور الحيوي الذي يقوم به ناتج هذا الجين، إذ انه يعد عامل استيطان فضلا عن كونه عامل ضراوة مهم لبكتريا *H.pylori* والذي يمكنها من البقاء في البيئة الحامضية لتجويف المعدة، حيث يتم الكشف عنه في اكثر من 90% من سلالات بكتريا *H.pylori* وبذلك يمكن أن يستخدم هذا الجين لغرض التشخيص في الكشف المباشر عن هذه البكتريا في الخزعة النسيجية للمعدة (Sugimoto وآخرون ، 2009). و أن سبب اختلاف نسبة الجين بين الحالات المرضية قد تعود أيضاً إلى انزيم اليوريز الناتج من هذا الجين الذي يعمل على تحلل اليوريا، ويمكن أن يفرز اليوريز من بكتريا *H.pylori* الى البيئة المحيطة وبذلك يحمي هذا الممرض من الاستجابة المناعية الخلطية (Humeral immune response) للمضيف. ويوجد هذا الانزيم في سيتوبلازم و على غشاء خلايا بكتريا *H.pylori* (Sachs وآخرون ، 2000). وان فعالية هذا الجين في امراض المعدة المختلفة يعود إلى دور انزيم اليوريز والناتج من هذا الجين في تحلل اليوريا وانتاج الامونيا التي تلحق الضرر في الطبقة المخاطية للمعدة من خلال تحطيم الروابط المحكمة وتغيير نفاذية النسيج الطلائي للمعدة، وكذلك يحفز أنزيم اليوريز الخلايا المناعية على إنتاج السايتوكينات الالتهابية التي قد تسبب ضرر لبطانة المعدة وتنتج أمراض مختلفة (Harris وآخرون ، 2010).

كانت نسبة الكشف عن الجين *cagA* الخاص ببكتريا *H.pylori* متباينة حسب الحالات المرضية، إذ سجلت أعلى نسبة لدى مرضى سرطان المعدة وقرحة المعدة وكانت 100% لكل منهما مع قرحة الاثني عشر وبنسبة 83.33% أما المرضى المصابين بالالتهابات المعوية فكانت نسبته الكشف عن هذا الجين 50% وأقل نسبة له سجلت في مرض الارتجاع المريء المعدة وكانت 0%. ان ارتفاع

نسبة الجين *cagA* في حالات سرطان المعدة، قد يعود لكونه من جينات الضراوة الرئيسة إذ يؤدي الذيفان الناتج منه إلى حدوث تغيرات في الخلايا الطلائية و عند دخوله ويفسفر بواسطة عائلة الكاينيزات الخلوية للمضيف مؤثرا في شبكات نقل الإشارات إلى الخلايا وهذه التغيرات تؤدي إلى تحفيز حدوث سرطان المعدة (Kalaf وآخرون ، 2015). حيث تشفر منطقة التجمع الجيني (pathogenicity island) (cagA الى النظام الافرازي الوظيفي من النوع الرابع ويسمح هذا النظام الإفرازي في النقل الموضعي (Trans-located) للبروتين CagA protein إلى الخلايا الطلائية للمعدة (Sozzi وآخرون ، 2005). ان وجود المنطقة الامراضية لهذا الجين (Cag island) تكون مرافقة للأمراض الشديدة التي تحدث بواسطة بكتريا *H.pylori* (Podzorisk وآخرون ، 2003). أن نسبة قليلة من المصابين ببكتريا *H.pylori* تتطور لديهم أمراض خطيرة وهذا يعتمد على جينات الضراوة التي تكون موجودة في سلالات خاصة من هذه البكتريا وغير موجودة في سلالات أخرى، وان من أهم جينات الضراوة التي تكون مرافقة للأمراض الخطرة هو الجين المرتبط مع السميةCytotoxin associated gene A (*cag A*) (Peek ، 2003 ؛ Atherton ، 2006)

. وتتوافق نتائج هذه الدراسة مع نتائج العديد من الدراسات اشارت إلى زيادة عامل الخطر للإصابة بسرطان المعدة يكون مرافق للإصابة بسلالات بكتريا *H.pylori* الموجبة لعامل الضراوة *CagA* (*Cover* و Blank ، 2005؛ Tiwari ، 2008 ؛ American Cancer Society،2012).

أما الجين *vacA* فجاء بنسب مختلفة عن الجينين السابقين حيث أعلى نسبة له كانت هي 60% في التهاب المعدة المزمن، ومن ثم قرحة المعدة وقرحة الأثني عشر بنسبة 50% لكل منهما، بينما سجلت حالات سرطان المعدة ومرض الارتجاع المريء المعدة نسبة 0% لكل منهما. تتفق نتائج هذه الدراسة مع النتائج التي حصل عليها الباحثان Jabbar و Al-obaidi (2015) و أن سبب اختلاف نسبة وجود هذا الجين بين الحالات المرضية المختلفة قد يعود الى فعالية هذا الجين التي تعمل على تكوين حويصلات حامضية (Acidic vacuoles) في سيتوبلازم خلايا المعدة الظهارية (Gastricepithelial cells) وذلك عن طريق احداث ثقوب في اغشية الخلايا الظهارية والتي تسمح تحرير الأيونات سالبة الشحنة (Anions) واليوريا والتي تسمح بتكون القرح الهضمية، و كذلك يعمل ناتج الجين على تفكك الروابط المحكمة للبطانة الظهارية وبالتالي تسمح للمغذيات من المرور خلال الحاجز المخاطي (Mucosal) barrier ومن ثم إلى بكتريا *H.pylori* (Yamaoka وآخرون 2006). أن عدم وجود هذا الجين في حالات السرطان في الدراسة الحالية قد يعود الى التنوع الوراثي لهذا الجين حيث توجد له أربعة انماط وراثية (Genotype) تكون متفاوتة في تحفيز حدوث سرطان المعدة (Falsafi وآخرون ، 2015). أن تفاوت نسبة الكشف عن هذا الجينات في الأمراض المختلفة ربما يعود إلى نوع الحالة المرضية ومرحلة تشخيص المرض وكذلك مناعة الشخص المصاب والتي عندما تكون الاستجابة المناعية ضعيفة تمكن

البكتريا من اختراق النسيج المبطن للمعدة وتسبب ضرر مزمن لدى المريض (Labigne و Reuse ، 1996).

كانت نسبة التداخل بين جينين من جينات الضراوة 79.1% إذ لم يكن لها تأثير واضح بين الأمراض المذكورة وجاءت بنسب مختلفة، أما التداخل بين الجينات الثلاثة جاءت بنسبة 12.5% وكان تأثيرها واضح في قرحة المعدة وقرحة الاثني عشر اذ سجلت 33.33%و25% على التوالي مقارنة بالأمراض الاخرى التي لم يظهر بها تداخل لهذه الجينات إذ أن التداخل بين الجينات الثلاثة قد يحفز حدوث قرحة المعدة والأثني عشر.

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات

بالاعتماد على نتائج هذه الدراسة استنتجنا ما يلي:

1. التشخيص الجزيئي بتقنية الـ PCR يكون ذو كفاءة عالية الخصوصية والحساسة للتشخيص والكشف عن جينات الضراوة لبكتريا *H.pylori* مباشرة من الخزعات النسيجية.

2. يمكن استخدام الجين *CagA* كواسم Marker Gen لحالات الاصابة بسرطان المعدة.

3. عدم الاعتماد على اختبار التحري عن الأجسام المضادة IgG لبكتريا *H.pylori* في مصل الدم كاختبار تشخيص للكشف عن الاصابة بهذه البكتريا.

4. لغرض تشخيص بكتريا *H.pylori* بصورة أدق يجب استخدام اكثر من طريقتين في التشخيص في نفس الوقت

التوصيات

استكمالاً للدراسة والبحث حول كل الجوانب المتعلقة ببكتريا *H.pylori* توصي الدراسة بما يأتي:-

1. دراسة الاصابة ببكتريا *H.pylori* عند الاطفال لقلة الدراسات المحلية بهذا الموضوع، ومعالجة الاصابة بهذه البكتريا في مرحلة الطفولة لتجنب حدوث امراض المعدة والامعاء المتسببة عن هذه البكتريا عند البلوغ.

2. دراسة مكثفة عن عوامل الضراوة الأخرى التي لم تشملها هذه الدراسة مثل (Adhesins, Flagella, Phospholipase.

الفصل الخامس المصادر

5-1 المصادر العربية

البلداوي، محمد رضا عبد الله (2007). عزل وتشخيص بكتريا *H.pylori* من المرضى المصابين بقرحة الاثني عشر دراسة أمراضيتها مقاومتها لمضادات الحياة. رسالة ماجستير، كلية العلوم- الجامعة المستنصرية.

حسين، جعفر عاشور. (2002). البكتريا الحلزونية في الخزع النسيجية للمعدية. دراسة جزيئية ونسيجية. رسالة ماجستير/ كلية الطب – جامعة بغداد.

الراوي، سراب خاشع (2005). دراسة بكتريولوجية ومصلية لبكتريا *H.pylori* المعزولة من المرضى العراقيين المصابين بداء السكري والقرح الهضمية .أطروحة دكتوراه- كلية الطب - الجامعة المستنصرية

الربيعي ، أسيل إسماعيل (2006). دور عديد السكريد الشحمي في امراضية بكتريا *H.pylori* المعزولة من المرضى العراقيين بقرحة الاثني عشر.رسالة ماجستير- كلية العوم -جامعة بغداد.

رديف، حلا مؤيد (2011) . تأثير بعض العوامل الفيزيائية والكيميائية على تكوين الاشكال المكورة لبكتريا *H.pylori* المعزولة من المرضى المصابين بقرحة الاثني عشري. مجلة العلوم العراقية 19-192:(3)52

السلمي، أمين عبد الجبار (2010). استفراد وتشخيص بكتريا *Helicobacter pylori* في مياه الشرب في محافظة البصرة / العراق. رسالة ماجستير- كلية العلوم -جامعة البصرة

الصكر، رباب قاسم محمد (2007). دراسة مرضية وجزيئية لبكتريا *H.pylori* المعزولة من المرضى المصابين بالقرح المعدية والمعوية. أطروحة دكتوراه- كلية العلوم -جامعة بغداد .

الظاهر، زينب عبد الجبار. (2001). دراسة بعض الجوانب البكتريولوجية والمناعية لبكتريا *Helicobacter pylori*. رسالة ماجستير - الجامعة المستنصرية لبعض مضادات الحياة ومحاولة تشخيصها. رسالة ماجستير – الجامعة المستنصرية.

محمد، نجاح علي. (2004). دراسة بعض معايير مصل الدم والأنسجة لدى المرضى المصابين بالتهاب وسرطان المعدة المرتبطة بوجود بكتريا *Helicobacter pylori*. رسالة دكتوراه –الجامعة المستنصرية.

الهادي، لمى مهدي كاظم (2001) دراسة حول استجابة بكتريا *Helicobacter pylori* لبعض مضادات الحياة ومحاولة تشخيصها. رسالة ماجستير – الجامعة المستنصرية.

5-2 المصادر الاجنبية

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.

Abu-Sbeih, R.; Hawari, A.; Hassawi, D. and Al-Daghistani, H. (2014). Isolation and detection of *Helicobacter pylori* from patients suffering from peptic ulcer using biochemical tests and molecular techniques.*AJBB*.,10(1): 58-68.

Aghili, R.; Jafarzadeh, F.; Ghorbani, R. (2013). The Association of *Helicobacter pylori* Infection with Hashimoto's Thyroiditis. *Tehran journal of biomedical*,5(8): 98-103.

Akopyant, N.; Bukanov, T. ; Westblom,W. and Berg, E. (1992). Sensitive, efficient detection of DNA diversity among clinical isolates by *Helicobacter pylori* by arbitrary primer PCR. *Iraqi Journal of Medical. Science*,8 (1): 161- 165.

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.

AL-Dhaher,Z.A (2001). Study of some bacteriological and immunological aspects of *Helicobacter pylori*. M.Sc thesis, College of Science, Al- Mustansyriah Univercity.

Alfizah, A.; Norazah, R.; Hamizah, E. and Ramelah, M. (2014). Resistotype of *Helicobacter pylori* isolates: the impact on eradication outcome. *Journal of Medical Microbiology*, 63(5):703–709.

Al-Ghamdi, A. ; Jiman-Fatani, A. and El-Banna, H. (2011). Role of Chlamydia pneumoniae, *Helicobacter pylori* and cytomegalovirus in coronary artery disease. *Pak J Pharm Sci*.,24(2): 95-101.

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 Univercity.

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

Al-Segar,R.(2007). Pathologic and molecular study peptic ulcer patients. Ph.D thesis, College of Science, Baghdad University.

Al-Sulami, A. A.; Al-Edani, T. A. and Al-Abdula, A. A.(2013): Similarity of *Helicobacter pylori* isolated from drinking water and peptic ulcer patients. *Am Based Res.J*.,2(3): 978-986.

American Cancer Society (2012). *Cancer Facts and Figures*. Atlanta, Ga: American Cancer Society.

Amini, M.; Karbasi, A. and Khedmat, H.(2009). Evaluation of eating habits in dyspeptic patients with or without Helicobacter pylori infection.*Journal of Tropical Gastroenterology*,30(3):142-147.

Andersen, L. and Rasmussen, L.(2009). *Helicobacter pylori*-coccoid forms and biofilm formation. FEMS Immun and Med. Microbiol.,56 (2): 112-115.

Ando, T.; Minami, M.; Ishiguro, K.; Maeda, O.; Watanabe, O. and Mizuno, T.(2006). Goto H. Changes in biochemical parameters related to atherosclerosis after *Helicobacter pylori* eradication**.** *Aliment Pharmacol Ther*.,4: 58-64.

Araújo, M.; Borini, P. and Guimarães, R.(2014). Etiopathogenesis of peptic ulcer: back to the past? Arq Gastroenterol., 51(2):155-61.

Atherton, J.C. (2006). The pathogenesis of *H.pylori* induced gastroduodenal diseases. Anuu. Rev .*Pathol.Mech.Dis;*1:63-96.

Axon, A.T.(2007). Relationship between *Helicobacter pylori* gastritis, gastric cancer and gastric acid secretion. Adv Med Sci.,52:55-60.

Ayada, K.; Yokota, K.; Kobayashi, K.; Shoenfeld, Y.; Matsuura, E. and Oguma, K.(2009). Chronic infections and atherosclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol*.,37(1):44-8.

Baban, F. and Mohammed, O. (2003). The Prevalence of *Helicobacter pylori* In Upper Gastrointestinal Disorders. (*JZS)Joutnal of Zankoy Sulainani*. 203,Part A:6(l) : l-8.

Bagheri, N.; Rahimian, G.; Salimzadeh, F.;Azadegan, M. and Rafieian,K.(2013). *Helecobacter pylori* virulence genes. *Microbiol*.,78(3): 189-198.

Bakir, W.; Al-kawaz, H.; Hasoon, H. and Majeed, A.(2012) Detection of DNA *Helicobacter pylori* and distribution of CagA genotype in cancerous and precancerous tissue. *Iraqi J. of cancer and medical genetics*,5(2): 127- 132.

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

Behnam, K.; Luca, F. and Markus, G (2015**)** Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Changes towards the Future. *Diseases, 3,* 122-135.

Blanchard, T. and Nedrud, J. (2012). Laboratory Maintenance of *Helicobacter* Species. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*., 28: 462-473.

Blaser, M. J.(2005)An Endangered Spice in the Stomach.*Scientific American J.*, 292(2): 38-45.

Boyanova, L .(2011). *Helicobacter pylori*.Caister Academic Press. *Clinical Microbiology Reviews,* 5(4):12-18.

Brown, L. M.(2000). *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev*.22(2): 283-97.

Bode, G.; Malfertheiner, P. and Mauch, F. (2003).The Coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol*. *Infect*, 111: 483 - 490.

Birch, A.; Hausler, B. and Hutter, R. (1990). Genome rearramgement and genetic istability in Streptomyces spp. *J. Bacteriol* . 5: 2529 - 2539.

Brown, L.; Thomas, T.; Ma, J.; Chang, Y.; You, W; Liu, W.; Zhang, L.; Pee, D. and Gail, M.(2002). *Helicobacter pylori* infection in rural China. *Demogr Bioinformatics and Biomedicine*(BIBM),8: 18-21.

Cesar, A.; Cury, P.; Payao, S.; Liberatore, P. and Silva, A.(2005). Comparison of histological and molecular diagnosis of *Helicobacter pylori* in benign lesions and gastric adeno carcinoma. *Brazilian Journal of Microbiology*,36:12-16.

Chen, T.; Chang, A. and Lee, S.(2002). Immunoglobulin G antibody against *Helicobacter pylori* and clinical implications of levels found in serum.*Clin Diagn Lab Immuno*,19:1044-1048.

Chang, N., and D. E. Tylor. (1990). Use of plused – Field agarose gel electrophoresis to size genome of Campylobacter species and construct aSalI map of *Campylobacter jejuni*, UA580. *J. Bacteriol*. 172: 5211 - 5217.

Cirak, M.; Akyön, Y. and Mégraud, F.(2007).Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Blackwell Journal*,(1): 4-9.

Cover, T. and Blanke, S.(2005). *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality.*Nat Rev Microbiol*.,3:320-332.

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

Debabrata, M.; James, B. and John, A.(2007). *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcers.*journal of Medicine*,35(4): 204-209.

Delluva, A.; Markly, K. and Davies, R.(1968) The absence of gastric urease in germ free animals.*Biochim biophyis Acta*,151:646-650.

Delport, W. and Vander, M. (2007). The transmission of *Helicobacter pylori* the effects of analysis method and study population on inference. Best Pract Res Clin. *Gastroenterol*.,21(2):215-221.

Devi, S. M.; Ahmed, A. A. and Khan, W.F. (2006). Genomes of *Helicobacter pylori* from native Peruvians suggest admixture of ancestral and modern lineages and reveal a western type *cag* pathogenicity island. *BMC Genomics*,7: 191-198

Di Rienzo, T.; Angelo, G.; Ojetti, V.; Campanale, M.; Tortora, A.; Cesario, V. and Zuccalà, G.(2013). 13C-Urea breath test for the diagnosis of Helicobacter pylori infection. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2:51-58.

Dixon M. (2001). Pathology of Gastritis and Peptic Ulceration. In *Helicobacter pylori*:Physiology and GeneticsASM press. Pp: 459-469.

Duleba, A. and Dokras A.(2012). Is PCOS an inflammatory process. Fertility and Sterility, 97(1): 7-12.

Dumrese, C.; Slomianka, L. and Ziegler, U. (2009). The secreted *H.pylori* cystein cause adherence of human monocytes different into a microphage . *Journal of Medical Microbiology*, Vol 40: 285 - 387.

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.

Eleftheria, R.; Alkaterini, R. ; Dionyssios, S.; Joanna, P.; Catherine, V.; Alexandros, P.; Kleoniki, R.; George, D.(2010). Endoscopic Tests for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children: Validation of rapid urease test., *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 22: 69–75.

Ernst, J.; Kuipers, G.; Pérez-Pérez, G.; Meuwissen, M.; Martin, J.; Blaser. G. (1995): *Helicobacter pylori* and Atrophic Gastritis: Importance of the cagA Status; JNCI Journal of the National Cancer Institute 87(23):1777-1780.

Erzooki, A.Y. and Manhal. F.S.(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 and Medical Research*,15(5): 1-9.

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 -1654.

Essawi, T.; Hammoudeh, W. and Sabri, I.(2013). Determination of *Helicobacter pylori* Virulence Genes in Gastric Biopsies by PCR. *ISRN.Gastroenterology*,4: 7-16.

Falaknazi, K.; Jalalzadeh, M. and Vafaeimanesh, J. (2010). Noninvasive Stool Antigen for Screening of *Helicobacter Pylori* infection and Assessing Success of Eradication Therapy in Patients on Hemodialysis. *Iran J Kidney Dis*.,4(4):317-321.

Falsafi, T.; Khani, A. and Mahjob, F.(2015). Analysis of *vacA/cagA* genotypes/status in *Helicobacter* pylori isolates from Iranian children and their association with clinical outcome.Turkish Journal of Medical Sciences,45: 170-177.

Farshad, S. Rasoli, M. and Alborzi, A. V.(2003). Simultaneous detection of *Helicobacter pylori* species using multiplex PCR method. *Iranian biochemical Journal*,8(4):205-209.

Ferlay, J. and Bray, F.(2010). cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Version 1.0.

Ferlay, J. and Shin, F. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*,127: 2893-2917.

Ferreira, J. and Moss, S.(2014). Current paradigm and future directions for treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Current Treatment Options in Gastroenterology*,12(4): 373-384**.**

Fikret D, Kaya Ö, Suna E, Vahap O, Mustfa A, Ebnem A. (2001). Relationship between atrophic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia and *Helicobacter pylori* infection. The Turkish J Gastro, 12, 169-170. (IVSL*European Journal of Gastroenterology & Hepatology*,14(6): 663-669.

Fischer, W.; Breithaupt, B.; Kern, S.; Smith, C. and Spicher, R.(2014). A comprehensive analysis of *Helicobacter pylori*plasticity zones reveals that they are integrating conjugativeelements with intermediate integration specificity. *BMCGenomics*,15: 310-314.

Forbes, B.; Sahm, D. and Weissfeld, S.(2007). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th 1056 pages.

Furuta, Y.; Namba-Fukuyo, T. and Shibata, l.(2014). Methylome diversification through changes in DNA methyltransferase sequence specificity. *Clin Microbiol Rev*.,19(3): 449-490.

Fyderek, K.; Przybyszewska, K. and BieLanski, W.(2006). Frequency of *Helicobacter pylori* infection in children under 4years of age. *Journal Phylosphy and Pharmacology*.57 (3): 122-133.

Gen R, M. and Ataseven H. (2010). Effect of *Helicobacter pylori* eradication on insulin resistance, serum lipids and low-grade inflammation. *South Med J.*, 103(3):190-199.

Gillespie, S**.** and Bamford, K.(2012). Vibro,*Campylobacter* and *Helicobacte*r. In: Medical Microbiology and Infection at a Glance. 4th Ed. John Wiley & Sons, Ltd.UK. Pp 57.

Goldsby, R.; Kinat, T and Osborne, B (2000). gene from Helicobacter pylori strains infecting patients at New York City. Kuby immunology. 4th ed. W.H. Freeman and company Pp 89.

Goodman, K. and Coorrea, P.(2004). Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*is due to null mutation in gene (rdXA) that encodes an oxygen – insensitive NADPH nitroreductase. *Mol. Microbiol*. 28: 383 - 393.

Go, M. ; Cissell, D. and Graham, M. (1998). *Helicobacter pylori* plasmids: epidemiology in different geographical region. Asian Pacific J Cancer Prev,3 (1): 5-11.

Graham, D. and El-Omar, E.(2013). *H. pylori***.** Nature review Gastrology and Hepatology. Lancet,:355-362.

Graham,D.(198) *Campylobacter pylori* and peptic ulcer. *Gastroenterology*, 96:615-625.

Harris, P.; Mobley, H.; Perez G. and Blaser M.(2010). Smith PD. *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and in • ammatory cytockine production. *Gastroenterology*, 111: 419–425.

Hassan, P. A.(2011). Detection of Immunoglobulin G and M Antibodies to *Helicobacter Pylori* in Serum by an Enzyme Immunoassay Method. *J. Edu. & Sci.*, 24(3): 54-59.

Helaly, G. ; El-Afandy, N.; Hassan, A. ; Dowidar, N. and Sharaf, S. (2009). Diagnostic Value of Housekeeping [glmM] Gene Expression in Antral Biopsies in Comparison to Rapid Urease Test and Histological Detection of *Helicobacter Pylori* Infection. *Egyp. J.of Med. Microbiol.*, 18(4) :132-138.

Heuermann, D., Jun, A. and R. Haas. (1995). genetic organization of a small cryptic plasmid of *Helicobacter pylori*. Gene. 165: 17 – 24.

Hussein, F.A. (2012): Study the expression of *P53* & PCNA in *cag A* positive strain. M.Sc thesis, College of Medicine, Baghdad university.

Holt, J. ; Kriegn, N.; staley, J and Williams, S.(1994). Growp 2 aerobic/ microaerophilic motile Helical/ viberoid gram negative bacteria In: Bergeys manual of determination Bacteriology**,** Pp. 42 - 48 19th edition Williams & Wilkins, USA.

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.

Jabbar, A. M.(2015). Bacteriological and Molecular Study of *Helicobacter pylori* in Gastro-intestinal Tract Infection**.** M.Sc thesis, College of Science, Al- Muthanna University.

Jani, O. and Günter, B.(2010). Morphology and Ultra structure of *Helicobacterpylori***.** foundonline, http : // www .ayurvedic-medicines. org/diseases/dyspepsia-symptoms.htm, accessedon august 19. (IVSL).

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.

Kalaf, E.A.(2013). Molecular Study for Detection of CagA Genotype of *Helicobacter pylori* from Endoscopic Biopsies of Iraqi Patients. Ph. D Thesis. Genetic Engineering and Biotechnology.

Kalaf, E.; Yassen, Y.; AL-Khafaji, Z.; Ghaith L. and Abas, B. (2015). Multiplex PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* isolated from Iraqi dyspeptic patients. *Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics*,3(5): 49-54.

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.

Karczewska, E.; Klesiewicz, K.; Skiba, I.; Wojtas-Bonior, I.; Sito, E. and Czajecki, K.(2012).Variability in prevalence of *Helicobacter pylori* strains resistant to clarithromycin and levofloxacin in Southern Poland. *Gastroenterol* Res Pract,10(5): 201-208.

Kargar, M.; Souod, N.; Ghorbani-Dalini, S.; Doosti ,A. and Rezaeian, A. (2011). Evaluation of cagA tyrosine phosphorylation DNA motifs in Helicobacter pylori isolates from gastric disorder patients in West of Iran. Sci. Res. Essays,6: 6454-8.

Kathren, P.; Haley, I. and Jennifer, A. (2015). *Helicobacter pylori* Genomic Insight into the Host-Pathogen Interaction. *International Journal of Genomics*,30: 578-587.

Kleanthous, H., ; Clayton, K. and Tabaqchali, S. (1991). Character ization of a plasmid from *Helicobacter pylori* encoding replication protein common to plasmids in a gram - negative bacterium. *Mol. Microbial*., 5: 2377 – 2389.

Konturek, J.(2003) Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogen tic role in peptic ulcer Gastritis and gastric Cancer. *J. physiol pharmacol.*, 54(3**)**: 24- 41.

Kucukazman, M.; Yavuz, B.; Sacikara, M.; Asilturk, Z.; Ata, N. and Ertugrul, D.(2009).The Relationship between Updated Sydney System Score and LDL Cholesterol Levels in Patients Infected with *Helicobacter pylori*. *Digestive Diseases and Sciences*,54: 604-609.

Kumar ,A.; Imran ,M.; Singh ,A; Chandel, D. and Talwar, A. (2010): Detection of Helicobacter pylori in Gastroduodenal Diseases by Real Time PCR.*Journal of Biomedical Sciences and Research*., 2 (3): 170-178.

Kuo, C.; Chen, Y.; Goh, K. and Chang, L. (2014). *Helicobacter pylori* and Systemic Disease. *Gastroenterol. Res. Pract.*, 358-494.

Kusters, J.; Vliet, A. and Kuipers, E.(2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection.Clin Microbiol Rev,19 (3): 449-90.

Kusters, J.; Vliet, A. and Kuipers, E.(2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Rev*iews, 19:449-90.

Labigne, A. and de Reuse, H.(1996). Determinants of *Helicobacter pylori* pathogenicity. *Infectous Agents Dis*ease,5: 191-202.

Langenberg, W.; Rauws, A.and Widojokusumo, G. (1986). Identification of *Campylobacter pyloridis* isolates by restriction endonuclease DNA analysis. *J. Clin. Microbiol*. 24: 414 - 417.

Lane, J.; Murray, L.; Sian, N.; Egger, M.; Harvey, I.; Donovan, J.(2006). Impact of *Helicobacter pylori* eradication on dyspepsia, health resource use, and quality of life in the Bristol helicobacter project: randomised controlled trial. *BMJ*., 2(3): 199-204.

Lee, S.; Lien, H. and Chang, A.(2012). Sheng-Shun, Yang; Yen-Chun, Peng. and Hong. Zen, YehThe Comparison of Biopsy Sites Measured by Rapid Urease Test for Diagnosed of *Helicobacter pylori* Infection Between a Population with Gastric and Duodenal Ulcers. *J.of GHR October*., 1: 226-229.

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

Lieber, C. and Lefevre, A. (1959) Ammonia as asource of gastric hypo - acidity in patients with uremia. *J. Clin. Invest*., 38: 1271- 1276.

Lim, C.; Lee, K.; Cho, M. and Chang, M.(2003). Detection of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of patients with gastroduodenal diseases by PCR- restriction analysis using the RNA polymerase gene (*rop*B). *J. Clin Microbiol*.,41(7): 3387- 3391.

Linz, B.; Windsor, H. and Gajewski, J.(2013). *Helicobacter pylori* genomic microevolution during naturally occurring transmission between adults**,** PLoS ONE.,8(12): 82-29.

Linz, B.; Windsor, H. and McGraw, J.(2014). A mutation burst during the acute phase of *Helicobacter pylori* infection in humans and rhesus macaques. *Nature Communications*, vol. 5, article 4165,. 245.

Long, M.; Lio, J.; Li, Y. and Zeng, F. (2009). Detection and evaluation of antibodies against neutrophil – activating protein of *H. pylori* in patients with gastric cancer .World J Gastroentrol 21; 15 (19): 2381-2388.

Longo, D.; Kasper, D.; Jameson, J.;Fauci, A.; Hauser, S. and Loscalso, J.(2012). Atherosclerosis**.**In:Harrison's principles of internal medicine. 18th Ed..Pp2513- 3211.

Lopes, A.; Vale, F.; Oleastro, M.(2014). *Helicobacter pylori* infection - recent developments in diagnosis. World J Gastroenterol.,10(7):9299-9313.

Luck, J.and Seth, T.(2006) Gastric urease. *Biochem J.*, 18**:** 1227 – 1231.

Lupski, J. and Weistock, G. (1992). Short interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* 174: 4525 – 4525

Lundin, A.(2004). Diversity and persist of *H.pylori* Swedish institute for infectious disease control and Microbiology and Tumor Center. Karolinaka Institute, Sweden. Stockholm. P:1-48.

MacFaddin, M. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. The Williams and Wiknis Co. Baltimore USA.

Malfertheiner, P.; Megraud, F.; Morain, C.; Atherton, J.; Axon, A. and Bazzoli, F.(2012). Management of *Helicobacter pylori* infection**.**the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. Gut. 61:646–664.

Mamoun, M.; Elsanousi, S. ; Khalid, A.; Abdelmounem E. and Mohamed A. (2015) Molecular Identification 0f 16s Ribosomal RNA Gene of *Helicobacter pylori* Isolated from Gastric Biopsies in Sudan. *American Journal of Microbiological Research*, 3(2): 50-54.

Marinus, M. G. (1987). Methylylation of DNA, American Society for Microbiology, 697 - 700.

Mandell, G.; Bennnett, J. and Dolin, R.(2010)Mandell, Douglas and Bennnett's principles and practice of infectious disease,[7th]ed. Elsevier Inc.2: 2557-2536, 2803-2813 . (IVSL).

Marshall, B. J. and Warren J. R.(1984)Unidentified curved bacilli in stomach of patients with gastric and peptic ulceration. *J. Lancet*, 1: 1311 - 1315.

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.

Marais, A.; Monteiro, A.; Occhialini, M.; Pina, H. and. Megraud, F. **(**1999). Direct detection of *Helicobacter pylori* resistance to macrolidesby a polymerase chain reaction/DNA enzyme immunoassay in gastric biopsy specimens. Gut 44:463–467.

Marshall, D.;Dundon, S; Beesley, C. and Smyth, M.(1998)*Helicobacter pylori* a conundrum of genetic diversity. Microbiology, 144: 2925 - 2939.

Meng, T.; Zhang, H. and Law, J.(2004). Identification of *H.pylori* DNA food sources by a novel multiplex PCR assay in″Diagnostic disease Week Turning Science to Medicin″ May 15-20. Morial Convention Center-New.

Módena, J.; Sales, A.; Acrani, G.; Russo, R.; Riberro, M.; Fukuhara, Y.; daSilveró, W.; Módena, J.; deOliveira, R. and Brocchi, M.(2007). Association between *Helicobacter pylori* genotypes and gastric disorders in relation to the cag pathogenicity island. *Diagnostic Microbiology* and Infectious Disease,59:7-16.

Mohammad. J. and Abdullah M.(2013). Detection of *H.pylori* cagA gene in patient's with gastroduodenal disease. *J. of university of anbar for pure science*, 7(1): 167-173.

Moosavian , M. ; Tajabakhsh ,S. and Sambrof, A.(2007). Rapid detection of clarithromycinresistant *Helicobacter pylo ri* in patients with dyspepsia by fiuorescent in situ hybridization compared with the E-test. *J. of micro Boil*., 27 (2):84-88.

Nasserolahei, M.; Jon, G. and Khalilian, A.(2014). Seropositivity of antibodies agents *H.pylori* and hepatitis A virus in Iran. *Ann.Saudi. Med*. , 24(1): 61-64 .

National center of biotechnology information, cited in March (2016). available from htpps://www. ncbi.nlm.nih.gov.

Nevine, M.; El Deeba, A. and Amany,y. (2015) An ultrastructural study of the association between *Helicobacter pylori* and the gastric mucos. *Egyptian Journal of Pathology*, 35:1-13.

Nedenskov, G.; Bukholm, U. and Bovre, K. (1990). Natural competence of genetic transformation in *Campylobacter pylori. J. Infect. Dis*. 161: 365 - 366.

Nurgalieva, Z.; Malaty, H.;Graham, D.; Almuchambetova, R.; Machmudovaet, A. and Kapsultanova,D.(2002). *Helicobacter pylori* infection in Kazakistan: effect of water source and household hygiene. *Am J Trop Med Hyg*, 67: 201-206.

Olson, J. and Maier, R.; (2002) Molecular hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori*. *Science*., 298 (5): 1788-1797.

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

Owen, R. J. Bickley, M. Moreno, M. Costas, and D. R. Morgan. (1991). Biotype and molecular profiles of cytotoxine - roducing strains of *Helicobacter pylori* from antral gastric mucosa. *FEMS Microbiol Lett.* 79: 199 - 204.

Parsonnat, J.; Welch, K.; Compton, C.; Strauss, R.; Timothy, W.; Kelsey, P. and Ferraro, M. (1988). Simple microbiological detection of *Campylobacter pylori*, *J. Clin. Microbiol.*, 26 (5): 948-949

Patrick, R.; Rosental, K. and Pfllar, M.(2005). *Helicobacter pylori*. In: Medical Microbiology, 5th edition. Philadelphia: Saunders. Pp. 253-99.

Prabhu V, Shivani A. (2014). An overview of history, pathogenesis and treatment of perforated peptic ulcer disease with evaluation of prognostic scoring in adultsAnn Med Health Sci Res. 4(1):22-9. (IVSL).

Peek, R.; Vaezi, M.;Falk, G; Goldblum, R. Perez-Perez, G. and Richter, J. (2002). Role of *Helicobacter pylori* cagA (+) strains and specific host immune responses on the development of premalignant and malignant lesions in the gastric cardia**.** *Int J. Cancer*, 82 :520-4.

Prevost, G., B. Jaulhac, and Y. Piemont. (2002). DNA Fingerprint - ing by pulsed - Filed gel electrophorisis is more effective than ribotyping in disting uishing among methicillin - resistant. *Clin. Microbial. And Antimicrobials*; 2 (11): 1 - 9.

Podzoriski, R., Podzoriski, D. ; Wuerth, A and Tolia, V.(2003). Analysis of the *vac*A, *cag*A, *cag*E, *ice*A and *bab*A_2 genes in *Helicobacter pylori* from sixty one pediatric patients from the Midwestern united states. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46:83-88.

Pounder, R.(2009). Glimpse of the Epidemiological Research on *Helicobacter Pylori* in Saudi ArabiaSaudi. *J.Gastroenterol*.,15(2) 85-88.

Pourakbari, B.; Ghazi, M.; Mahmoudi, S.; Mamishi, S.; Azhdarkosh, H and Najafi, M.(2013). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by invasive and noninvasive tests. *Braz. J. Microbiol*., 44(3):795-800.

Polenghi, A.; Bossi, F.; Fischetti, F. and Durigutto, P. (2007):The neutrophil-activating protein of h pylori crosses endothelia to promote neutrophil adhesion in vivo. *J Immunol*, 178:1312-1320.

Qiang, H.; Jian-Ping, W.; Michael,O. and Lawrence, B.(2002). Real-Time Quantitative PCR for Detection of *Helicobacter pylori* Department of Bioimmunotherapy,The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center,1 and Veterans.

Qureshi, N.; Gallaher, B. and Schiller, L. (2014). Evolution of amoxicillin resistance of *Helicobacter pylori in vitro* : characterization of resistance mechanisms, *MicrobialDrug Resistance*, 20 (6): 509-516.

Rahman, S.; Azam, M.; Rahman, M.; Arfin, M.; Alam, M. and Bhuiyan, T.(2008). Non-invasive diagnosis of H pylori infection: evaluation of serological tests with and without current infection marker. *CIM World J Gastroenterol*.,14(8):1231-1237.

Ribeiro, M.; Vitiello, L.; Mirand, M.; Gody, A.; Pedra, Z. and Zoli, A.(2003)Mutations in the 23s rRNA gene are associated with clarithromycin resistance in *H. pylori* isolation Brazil. Ann. *Clin. Microbial. And Antimicrobials*, 2(11): 1- 9.

Rimbara, E.; Sasatsu, M. and David, Y. (2013). PCR Detection of *Helicobacter pylori* in Clinical Samples. *Methods Mol Biol*., 943: 279–287.

Roch, G.; Saliva, L.; Santons, A.; Bocewicz, A. and Queiroz, D.(2003). Transmission of *Helicobacter pylori* infection in families of preschool-aged children from Minas Gerais, Brazil. Trop Med Int Helth.,8:987-991.

Rownald, M.(2000). Transmission of *Helicobacter pylori* : Lancet. 355

Ruddon, Raymond W. (2007). *Cancer biology* (4th ed. ed.). Oxford: Oxford University Press. p. 223.

Rust, M.; Schweinitzer, T. and Jonsenhans, C.(2008). *H.pylori* Flagella, Motility and Chemotaxis. In Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* Molecular Genetics and Cellular Bio. Lancet, 1:1311-1315.

Ryan, K .and Ray, C.(2010). *Helecobacter pylori* in: Sherris Medical Microbiology.5th ed McGraw-Hill. pp. 573- 576.

Salama, N., Guillemin, K., McDaniel, T. K., Sherlock, G., Tompkins, L., Falkow, S. (2000). Awhole - genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strain. *proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 14668 - 14673.

Sachs, G.(2000). Expression of *Helicobacter pylori* urea I gene required for acidic pH activation of cytoplasm urease. *Infection and Immune*.68:470-477.

Salih, B.; Bolek, B.; Arikan, S.(2010). DNA sequence 22. analysis of cagA 3' motifs of Helicobacter pylori strains from patients with peptic ulcer diseases. *J. Med. Microbiol*., 59: 144-8.

Sambrook, J. and Russel, D.(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.

Salimzadeh, L.; Bagheri, N. and Zamanzad, U.(2015) Frequency of virulence factors in *Helicobacter pylori*-infected patients with gastritis. *Microbiol. Pathog*, 3: 1-6.

Sambrook, J. and Russel, D.(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.

Schubert, L. and Peura D.(2008). Control of gastric acid secretion in health and disease.*Gastroenterology*,134 (7): 1842–60.

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″.

Slinger, R.; Yan, F. and Chan, N.(2009). Pyrosequencing assay to rapidly detect clarithromycin resistance mutations in Canadian *Helicobacter pylori* isolates, *Canadian Journal of Gastroenterology*, 23(9): 609-612.

Smith, S.; Oyedeji, K.; Arigbabu, A.; Cantet, F.; Megraud, F.; Ojo,O.; Uwaifa,A.; Otegbayo, J.; Ola, S. and Coker,A. (2004). Comparison of three PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. *World. J. Gastroenterol*.,10:54-60.

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.

Sozzi, M., Tomasini, M. ; Vindigni, C.; Zanussi, S.; Tedeschi, R.; Basaglia, G.; Figura, N. and Paoli, P.(2005). Heterogeneity of *cag* genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection.*Journal Clinical Laberatory Medicine*,146(5): 262-269.

Stasi, R. and Provan, D.(2008). *Helicobacter pylori* and Chronic ITP. Hematology Am Soc Hematol Educ Program,206-211.

Stenström, B.; Mendis, A. and Marshall, B.(2008*). Helicobacter pylori* The latest in diagnosis and treatment**.** *Journal of Applied Medical Sciences*,1(1): 15-26.

Stephanie, A.; Chisholm, L.; Robert, J.; Owen, L. and Steth S. (2001) PCR-Based Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection and Real-Time Determination of Clarithromycin Resistance Directly from Human Gastric Biopsy Samples. *journal of clinical microbiology*, 39 (4): 1217–1220.

Steven, F.; Abdalrahman, M.; Abdalla, Vladimir, Makarov.; Zoltan, Hanzely.; Guillermo, I.; Martin J.and Peter, H.(2001). Increased Gastric Epithelial Cell Apoptosis Associated with Colonization with cagA1 *Helicobacter pylori* Strains. Cancer research, 61:1406–1411.

Suerbaum, S. and Michetti, P.(2002). *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl. J. Med*.347(15):1175-1186.

Suganuma ,M.; Yamaguchi, K.; Ono, Y.; Matsumoto, H.; Hayashi, T. and Ogawa T. (2008). TNF-α-inducing protein, a carcinogenic factor secreted from *H. pylori*, enters gastric cancer cells. *Int. J. Cancer*.123(1): 117-22.

Sugimoto, M.; Wu, S. and Abudayyeh, J.(2009). Unreliability of results of PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical or environmental samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(3): 738–742.

Tadesse, A. and Alem, M. (2006) . Medical Bacteriology . EPHTI . Gondar University .

Taylor, D.; Purych, D. and Hiratsuka, K. (1997). Cloning and sequence analysisi of two copies of a 23S rRNA gene from Helicobacter pylori and association of Clarithromycin resistance with 23S rRNA mutation. *Antimicrob Agents Chemo ther*., 41: 2621 – 2628

Tanih, N.; Clarke, A.; Mkweshana, N.; Green, E.;Ndip, L. and Ndip, R. (2008). *Helicobacter pylori* infection in Africa. Pathology and microbial diagnosis. Afr J Biotechnol.,7: 4653-4662.

Thiar, W. A.(2010). Assessment of cell proliferation & apopotosis in patients of cag A *H.pylori* strain gastritis. Ph.D. thesis submitted to College of medicine ,Al-Nahrian university ,Iraq.

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.

Tiwari, S.; Manoj, G.; Kumar, G.; Sivaram, S .; Hassan, B.; Prabhakar, U.; Devi, S.; Jalaluddin, K.; Kumar, S. and Ahmed, A.(2008).Prognostic significance of genotyping *Helicobacter pylori* infection in patients in younger age groups with gastric cancer Postgrad. *Med*.,84(9): 193-197.

Toft, C. and Andersso, S. G(2010). Evolutionary microbialgenomics: insights into bacterial host adaptation, NatureReviews Genetics, 11(7): 465-475.

Tomb, J.; Sutton, G.; Glodek, A. ; Zhou, L.; Whie,O. and Utterback,T. (1996). The complete DNA sequence of the *Helicobacter pylori* genome.Gut.39:A2.

Vaira,D.;Gatta,L.;Ricci,C.;Migloili,M.(2006). diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Review article *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16: 125-130.

Vander- Ende, A.; Rauws, M.; Feller, G.; Tytagat, E. and DanKert, J.(1996). Heterogeneous *Helicobacter pylori* isolates from members of a family with a history of peptic ulcer disease. Gastroenterology 111: 638 – 647.

Valliani, A.; Khan, F.; Chagani, B. and Khuwaja, A.(2013). Factors Associated with *Helicobacter Pylori* Infection, Results from a Developing Country Pakistan. *Asian Pacific J Cancer Prev*,14 (1): 53-56.

Versalovic, J.(2003). *Helicobacter* In Manual of clinical microbiology Seventh edition volume I. chap. 51 ; p, :727-738.

Wang, y.; Chen, K.; Chung, L.; Meng, W. and Hsiang. S.(2015) Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*,21(40): 11221-1123.

Wang, Y. and Taylor, E. (1990). Natural transformation in Campylobacter species. *J. Bacteriol*. 172: 949 - 955.

Warren, J.(1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis**.** Lancet; i: 1273.

Weijmen, C.; Wit, N.; Numans, M.; Kyipers; A. and Verheij, T.(2001). *Helicobacter pylori* testing in the primary care setting; Which diagbostic test should be used. Alimen. Pharma. Theraput. S: 1205 - 1210.

Wroblewski, L.; Peek, R. and Wilson,K. (2010) *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. *Clinical microbiology reviews* . 23(4): 713–739.

Wotherspoon, A..; Ortiz, H. C.; Faizon, M. R. and Issacseon, P. G. (1991). *Helicobacter pylori* – associated gastritis and primary B - cell gastric Lymphoma. Lancet. 338: 1175 - 76.

Yan, W.; Chang, B. and D. E. Taylor. (1991). Pulsed – Field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genomic DNA and its epidemio logec application. J. *Infect. Dis*. 163: 1068 - 1072.

Yamaoka, Y.; Ojo, S.; Fujimoto, S.; Odenbreit, R.; Haas, O.; Gutierrez, H.; El-Zimaity, R.; Reddy, A.; Arnqvist, Y. and Graham, D.(2006). *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut*, 55:775-781.

Yamazaki, S., A. Yamakawa, Y. Ito, M. Ohtani, H. Higashi, M. Hatakeyama, and T. Azuma.(2003). The cagA protein in *Helicobacter pylori* into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa J. Infect. Dis. 187: 334 - 337.

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

Zhou, Y.; Xu, L.; Wang, B.; Fan, X. and Wang, C.(2012). Modified sequential therapy regimen versus conventional triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication in duodenal ulcer patients in China: A multicenter clinical comparative. *Gastroenterol Res Pract*, 8(4):453-466.

Summary

The present study was carried out to investigate *Helicobacter pylori* in the patients were infected with gastrointestinal diseases by four tests which are: rapid urease test , anti *H.pylori* IgG test, bacterial culture and diagnosis it directly in biopsies samples by 16S *rDNA* gen. In addition to detected some virulence genes (*ureA*, *cagA* and *vacA*) of this bacteria by polymerase chain reaction (PCR).

The study include 40 blood and tissue biopsy samples collected from outpatient attended Endoscopy Unit at Baqubah Teaching Hospital in Diyala province from the period October 2015 to February 2016. during endoscope exam noted 10 of patient without any gastrointestinal diseases considered as control group and 30 patient with gastrointestinal diseases considered as patient group which include (12) 40% of patient group are chronic gastritis, (7) 23.34% duodenal ulcer while showed (5) 16.67% gastric ulcer while gastric esophagus reflux disease (GERD) was (4) 13.33% and (2) 6.67% gastric cancer. The bacteria was diagnosed by 4 difference tests included rapid urease test to antral biopsy, detection of antibodies (IgG) to this bacteria in serum, bacterial culture test and detection 16S *rDNA* gen of this bacteria in biopsies.

The result clarified presence of *H.pylori* in (13) 43.33% of biopsies by rapid urease test to biopsy, while showed Rapid anti *H. Pylori* test (IgG) present it in (17) 56.67% , bacterial culture gave (3)10%posive result and the highest percentage to the diagnosis this bacteria was by detection 16S *rDNA* by using PCR where recorded (24) 80%. Molecular detection of virulence genes (*ureA*, *cagA* and *vacA*) in *Helicobacter pylori* infected patients dependent on PCR Showed (22) 91.66% of biopsies have *ureA* gen its important genes that responsible of bacterial virulence and encoded to subunit of urease enzyme, while the *cagA* encoded to protein binding with cytotoxicity about (16) 66.66% and gave *vacA* gene that encoded to protein that lead to visculation cells about (11) 45.83% of biopsies that obtained from patient group. The interaction percentage between three genes were (3) 12.5% It had cleared effect in gastric cancer and duodenal ulcer only.

The present study concluded that the PCR technique is suitable for accurately detection of these bacteria directly from gastric biopsy specimens and *cagA* gen limited in highest percentage in gastric cancer cases unlike *vacA* gene.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
Diyala University
College of Science

Bacteriological and Genetic Study on *Helicobacter pylori* Isolated From Human Stomach Infection

A Thesis

Submitted to council College of Science, Diyala University, in Partial Fulfillment of Requirements for the Degree of Master of Science in Biology

By

Ali Ghazi Hamdi

Supervised By

Dr. Mothanna Abdulkahder Al-Mahdawi

November 2016. Safar1437