تأثير بعض العوامل الكيميائية والفيزيائية على تكوين الاشكال المكورة لبكتريا Helicobacter pylori المعزولة من المرضى المصابين بقرحة الاثنى عشري

حلا مؤيد رديف ، ضحى سعد صالح

قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة بغداد. بغداد- العراق

الخلاصة

تضمنت الدراسة عزل جرثومة Helicobacterpylori من المرضى المصابين بقرحة الاثنى عشر ودراسة ظاهرة تحول الخلايا من الاشكال الحلزونية الى الاشكال المكورة والعوامل المؤثرة، اذ عزلت الجرثومة من الخزعات النسيجية المأخوذة من مرضى يعانون من قرحة الاثنى عشر (Duodenal ulcer) استخدمت عدة طرق لتشخيص الجرثومة في الخزعة النسيجية، اخذت خزعتان نسيجيتان من كل مريض، استخدمت الاولى في عزل جرثومة H. pylori باستخدام وسط سكرو (Ski row medium) بينما استخدمت الخزعة النسيجية الثانية في اختبار انظيم اليورياز السريع، كانت درجة الحرارة المثلى للنمو ٣٧م، واظهرت الجرثومة مقاومة المضاد الحيوي نالدكسك اسد (Nalidixic Acid) وحساسية اتجاه المضاد الحيوي سيفالوثين (Cephalothin). تم تشخيصها اعتمادا على شكلها وتفاعلها مع صبغة كرام، والصفات الكيمو حيوية، وقد بينت النتائج ان مكونات الوسط الزرعي والضوء والاوكسجين من اهم العوامل التي تساعد على عملية تحول الاشكال الحلزونية الى الاشكال المكورة لجرثومة H. pylori خلال مدة الحضن والخزن، فقد لوحظ عند استخدام وسط اغار نقيع الدماغ – القلب، ووسط اغار الدم الاساسي المضاف اليهما دم بشري متحلل بنسبة (٥%)، واضافات النمو يتم الحصول على الاشكال المكورة بنسبة اقل مما لو استخدمت الاوساط الزرعية ذاتها لكن بدون اضافة الدم واضافات النمو. وللمحافظة على حيوية جراثيم الهليكوبكتر وعلى شكلها الحلزوني لمدة زمنية اطول قد تصل الى (٢٠ – ٣٠) يوماً عند خزنها بدرجة حرارة (٤) مْ، يجب عدم تعريض الاوساط الزرعية الى الضوء والاوكسجين بنسبة اعلى من (٥%)، كذلك مراعاة ان تكون باءهاء (PH) الوسط (6.9-8).

EFFECT OF SOME CHEMICAL AND PHYSICAL FACTORS ON THE COCCI SHAPE FORMATION OF HELICOBACTER PYLORI ISOLATED FROM PATIENTS WITH DUODENUM ULCER

Hala Mouyed Radif, Dhuha Saad Saleh

Departement of biology, College of science, University of Baghdad.Baghdad-Iraq

Abstract

Helicobacter pylori was islotaed localy from patients with Duodenal Ulcer. Two biopsies were taken from each patient, the first used for isolation of H. pylori using ski row medium, the second used for rapid urease test. Optimum growth temperature was 37 c̊. Isolated H. pylori was identified according to bacterial shape, graw stain, biochemical test, sensitivity to cephalothin & resistance to nalidixic acid. The result showed that component of culture media, light, & oxygen are important factors

affecting Hansformed from spiral to coccoid shapes. It has been noticed that using Brain – heart infusion a gar and blood a gar base with growth supplement give &5% blood, percentage transformation to coccoid shape was less than using the same culture media without blood and growth supplements. Results indicated that avoiding exposure of culture media to light and oxygen (more than 5%) maintain spiral shape of H. pylori for 20 – 30 days when stored at 4 c°taking in consideration a pH of (6.9 – 8).

المقدمـــة:-

اتجهت انظار العالم الــى جرثومـــة (Helicobacter pylori) عام ١٩٨٣ عندما اشار كل مـــن وارن (Warren) ومارشال (Marshall) الى العلاقة الوثيقة لهـذه الجرثومـــة بالتهاب المعدة المزمن الفعال (Chronic active gastritis) وبقرحة العفج (Duodenal ulcer) [١].

وقد اثبتت الدراسات المتتالية العلاقات الفعلية بين الامراض الالتهابيـــة المعديـــة العفجيـــة (Gastro duodenal inflammatory diseas) وجرثومة H. pylori فضلاً عن ذلك اشير الى وجود علاقة بين جرثومة H. pylori وسرطان المعدة حيث اشارت الوكالة الدولية لابحاث السرطان التابعـــة لمنظمة الصحة العالمية في عـــام ١٩٩٤ ان جرثومـــة H. pylori تدخل ضمن المسرطنات من الصـــنف الاول وهـــي اخطر اصناف العوامل المسببة للسرطان [2].

اكدت الدراسات الوبائية انتشار الخمج بجرثومة H. pylori والامراض المصاحبة له في انحاء العالم اجمع وفي مختلـــف الفئات العمرية، وعموماً يكون الخمج في الـــدول الناميـــة ذا انتشار اكبر عما هو موجود في الدول المتقدمة ليعكس حقيقة ارتباط الخمج بالحالة الاجتماعية والوعي الصحي للفـــرد [3] جرثومة H. pylori عصيات سالبة لملون غـــرام ومتحركـــة وغير مكونة للابواغ ذات ابعـــاد (٠.٥ – ٠.٩) مـــايكرومتر عرضاً و (٢-٤) مايكرومتر طولاً وتتميز هـــذه الجرثومـــة بظاهرة تعدد الاشكال (Pleomorphisim) اذ انهـــا تظهـــر بشكلين مظهريين الشكل المنحني او الحلزونـــي (Spiral Form) والشكل المكور (Coccoid Form) فضلاً عن الشكل العصوي المنحني(Curved rod)وعصوي وعلـــى شـــكل الحرف (V) وعي شكل الحرف (U) وغيرها من الاشـــكال. تتصف جرثومة H.pylori بقابليتها الفائقة على انتاج انظـــيم اليورياز (Urease) الذي يعد من اهم الصفات المميزة لجنس (Helicobacter)، كما ان لهذه الجرثومة القدرة على انتـــاج انظيمات اخرى مثل انظيم الاوكسيديز (Oxidase) والكاتاليز (Catalase)، في حين تتصف هذه الجرثومة بعدم قابليتهـــا على تحلل الهيبورات (Hippurate hydrolysis) واختـــزال النترات وتكون الاندول وعدم ظهور نمـــو فـــي المســـتنبت الجرثومي الحاوي على كلوريد الصـــوديوم بنســـبة (١%) و (٣.٥%)(5,4). تستطيع هذه الجرثومة تقويض الحمـــوض الامينية بوساطة المسار الاختماري كما هو الحال في الجراثيم اللاهوائية [6]، كما تحتوي على حبيبات متعـــددة الفوســـفات (Polyphosphate granules) التي تســـتخدمها بوصـــفها مصدراً للطاقة في حالة غياب مصدر الطاقة الخـــارجي[7]، وهي اليفة الهـــواء القليـــل (Microaerophilic) ومســـتهلكة للكاربوهيدرات وغير منتجة للصبغات تتحرك بحركة مشابهة لانطلاق السهم (Darting Motility). بوساطة سوط واحد في احد قطبي الخلية او كليهما او بوساطة اسواط متعددة يصـــل عددها (٤-٦) اسواط، وقـــد يبلـــغ طـــول الســـوط (٣-٥) مايكرومتر تقريباً وان قطـــر الســـوط الواحـــد يبلـــغ (٣٠) نانوميتراً. ولقلة الدراسات المتعلقـــة بالمواصـــفات الشـــكلية والمزرعية لهذه الجرثومة هدف البحث الحالي الى معرفة ما يتعلق بتغير اشكالها ودراسة تأثير بعض العوامل الكيميائيـــة والفيزيائية المؤثرة وتغير شكل البكتريا من الشكل الحلزونـــي الى المكور.

المواد وطرائق العمل:-

١- العزل:

عزلت جرثومة H. pylori من مرضى يعـــانون مـــن قرحة الاثنى عشري (Duodenalulcer) وجمعت العينـــات من وحدة الناظور في مدينة الطب / مستشفى بغداد التعليمـــي ومركز الجهاز الهضمي للمدة مـــن ٢٠/١٠/٢٠٠٤ ولغايـــة ٢٧/١١/٢٠٠٤ ومن كلا الجنسين وضمن الفئة العمرية مـــن (٢٠ – ٨٠) سنة حيث اخذ من كل مريض خزعتين نسيجيتين من منطقة غار المعدة بوساطة الملقط الخاص بجهاز الناظور. حفظت العينات النسيجية في انبوب زجاجي (vial) تحـــوي على محلول ملحـــي فســـيولوجي (saline) لنقـــل الخزعـــة النسيجية الاولى الى المختبر وحفظت فـــي صـــندوق مبـــرد ولغرض عزل الجرثومة باستخدام وســـط ســـكرو واجـــراء المسحة المباشرة للخزعة النسيجية وامـــا الخزعـــة الثانيـــة الماخوذة من نفس المريض استخدمت فـــي اختبـــار انظـــيم

اليورياز السريع اذ وضعت في انبوب حاوي على وسط اليوريا السائل.

٢- زرع العينات:-

بعد ايصال العينات الى المختبر وخلال مدة لا تتجاوز الساعتين تم سحق عينة الخزعة النسيجية بوساطة جهاز Homogenizer وثم نقل بوساطة الناقل (Loop) جزء من النسيج المسحوق وزرع على وسطي سكر و المجهز بالمضادات الحيوية (Trimethprim 5, & Vancomycin B 2.5 Polymyxin B 10)، والوسط الانتقائي الثاني (وسط البلداوي المحور) [8]باستخدام المضادات الحيوية نفسها اضافة الى المضاد الحيوي (Amphotericin B) واضيفت المضادات الحيوية الى الوسط بوساطة وحدة الترشيح (Filter unit) بقطر ثقب ٠.٢٢ مايكرون بطريقة التخطيط (Streaking) وبثلاث مكررات لكل عينة نسيجية وضعت الاطباق في وعاء لاهوائي معقم (Auaerobic Jar) تتوافر الظروف الغازية الاليفة للهواء القليل باستخدام عدة تحرير الغاز (Gas generating Kit) المجهزة من شركة (Oxoid) مع وجود العامل المساعد (Catalyst) لتوفير الظروف الغازية المطلوبة (N_2 85%, O_2 5%, CO_2) ثم وضع في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٧ م لمدة (٣-٥) ايام.

٣- تشخيص الجرثومة:-

شخصت الجرثومة بالاعتماد على مصنف بيرغي [9] وبالطرائق المستخدمة من كروك شانك [10] وباستخدام اختبارات: اختبار انظيم اليورياز السريع وملون غرام مع مراعاة استبدال السفرانين والاوكسداز بالاضافة الى اختبارات اخرى مثل النمو في درجات الحرارة (٢٥)، (٤٠) واختبار الحساسية لمضادين الحياتين حامض النالدكسك والسيفالوثين والتحري عن حركة الجرثومة بطريقة القطرة المعلقة.

٤- العوامل التي تؤدي الى تكوين الاشكال المكورة لجرثومة H. pylori في الاوساط الزرعية الصلبة خلال مدة الحضانة والخزن:-

١- تأثير مكونات الوسط الزرعي في انتاج الاشكال المكورة لجرثومة H. pylori:-

زرعت جرثومة H. pylori بشكلها الحلزوني على الاوساط الزرعية الاتية:-

١- وسط اغار الدم الاساس رقم ٢ يحتوي على (٥%) دم بشري متحلل فقط.
٢- وسط اغار نقيع الدماغ - القلب يحتوي على (٥%) دم بشري متحلل فقط.
٣- وسط اغار الدم الاساس رقم (٢) يحتوي على (٠.٠٢٥%) اضافات النمو وهي , Ferrous, sulfate Sodium metabiasulfate, Sodium pyrovate وبدون ان يضاف اليه دم.
٤- وسط اغار نقيع الدماغ - القلب يحتوي على اضافات نمو بدون ان يضاف اليه دم.
٥- وسط اغار الدم الاساس رقم (٢) يحتوي على اضافات النمو و (٥%) دم بشري متحلل.
٦- وسط اغار نقيع الدماغ - القلب يحتوي على اضافات نمو و (٥%) دم بشري متحلل.

كانت باء هاء الاوساط جميعاً (٧.٤)، وقد زرعت جرثومة H. pylori بمعدل طبقين لكل وسط من الاوساط المذكورة. حضنت الاطباق بدرجة37 م مدة (٤٨) ساعة. ثم حسبت النسبة المئوية للاشكال المكورة لكل طبق من الاطباق ويكون ذلك بعمل مسحة مجهرية مباشرة وصبغها بملون غرام، ثم تعد الاشكال المكورة والحلزونية العائدة لجرثومة H. pylori، ثم يضرب الناتج النهائي في الرقم (١٠٠). سجلت النتائج ثم قورنت نتائج كل وسط مع الاوساط الاخرى.

٢- تأثير الضوء والظلام والظروف الغازية في انتاج الاشكال المكورة لجرثومة H. pylori خلال مدة الخزن:-

زرعت جرثومة بشكلها الحلزوني على وسطي اغار الدم الاساس رقم ٢ واغار نقيع الدماغ - القلب اللذين يحويان على (٥%) دم بشري متحلل واضافات النمو التي هي كبريتات الحديدوز وثنائي كبريتيت الصوديوم وبايروفات الصوديوم المجهزة من شركة (Oxoid) بمعدل (٥) اطباق لكل نوع من الاوساط المذكورة. حضنت الاطباق بدرجة37 م لمدة (٤٨) ساعة ثم وزعت الاطباق مباشرة بعد الحضن الى (٥) مجاميع، وفحصت بعد ذلك المجموعة الاولى من الاطباق حال اخراجها من الحاضنة ثم حسبت النسبة المئوية للاشكال المكورة.

المجموعة الثانية من الاطباق، خزنت في الظلام بوضع الاطباق في صندوق صغير مصنوع من الورق السميك مع طي جوانبه اجمع الى الداخل منعاً لدخول الضوء، في ظروف غازية مثلى باستعمال Gas generating kit المجهز من

شركة (Oxoid) حيث اضيف (١٠) مليلتر من الماء المقطر الى محتويات الكيس، ثم وضع بسرعة في الصندوق الحاوي على الاطباق، خزن الصندوق مع الاطباق بدرجة ٤ م مدة (٥) ايام، حسبت بعدها النسبة المئوية للاشكال المكورة لكل طبق. خزنت المجموعة الثالثة من الاطباق في الظلام بالظروف السابقة نفسها وفي ظروف هوائية؛ اي بدون استخدام Gas generating kit. وضع الصندوق مع الاطباق بدرجة٤م مدة (٥) ايام حسبت بعدها النسبة المئوية للاشكال المكورة.

اما بالنسبة للمجموعة الرابعة من الاطباق فخزنت في وعاء زجاجي (Glass Jar) مع توافر ظروف غازية ملائمة على ان يتم تعريض الاطباق الى ضوء النهار؛ وذلك بوضع الوعاء الزجاجي في ثلاجة مصرف الدم (Blood bank) (في ثلاجة ذات واجهة زجاجية وليست معدنية) فيسمح الزجاج بمرور الضوء من خلاله الى الاطباق مع مراعاة عدم تعريض الاطباق الى اشعة الشمس، درجة حرارة الثلاجة ٤ م.

حسبت النسبة المئوية للاشكال المكورة بعد مرور (٥) ايام من الخزن. خزنت المجموعة الخامسة من الاطباق في وعاء زجاجي بظروف هوائية حيث لم يتم وضع الغطاء الخاص بالوعاء بل ترك مفتوحاً مع تعريض الاطباق الى ضوء النهار بوضعها في ثلاجة مصرف الدم بدرجة ٤ م مدة (٥) ايام، حسبت بعدها النسبة المئوية للاشكال المكورة لكل طبق، يلاحظ الجدول (١).

رقم المجموعة	مصدر الضوء	مدة الخزن (ايام)	درجة حرارة الخزن	الظروف الغازية
١	–	تفحص مباشرة بعد الخزن	–	–
٢	–	٥	٤	اليفة الهواء القليل
٣	–	٥	٤	هوائية
٤	ضوء النهار	٥	٤	اليفة الهواء قليل
٥	ضوء النهار	٥	٤	هوائية

جدول ١: استخدام ظروف مختلفة لخزن جرثومة H. pylori

٣- تأثير باءهاء الوسط الزرعي في انتاج الاشكال المكورة خلال فترة الحضن:-

زرعت جرثومة H. pylori على وسط اغار الدم الاساس واغار نقيع الدماغ – القلب اللذين يحويان على اضافات النمو ودم بشري متحلل بنسبة (٥%) بمعدل اربعة اطباق لكل وسط بحيث يكون باءهاء الاطباق ٦.٩ – ٧ – ٧.٢ – ٧.٤ على التوالي. حضنت كل الاطباق الحاوية على وسط اغار الدم الاساس واغار نقيع الدماغ – القلب بدرجة حرارة ٣٧ م مدة (٢٤) ساعة. فحصت الاطباق مباشرة بعد الحضن فكانت جميعها تحتوي على جرثومة H. pylori بشكلها الحلزوني بنسبة (١٠٠%) خزنت بعدها الاطباق في الظلام بدرجة ٤ م بظروف غازية اليفة الهواء القليل مدة (٥) ايام ثم حسبت النسبة المئوية للاشكال المكورة. بعد الحصول على النسبة المئوية للاشكال المكورة، سجلت النتائج، ثم قورنت نتائج كل وسط مع الوسط الاخر الذي يختلف عنه في الباءهاء، لمعرفة افضل باءهاء تستطيع H. pylori مقاومته خلال زمن الحضن والخزن.

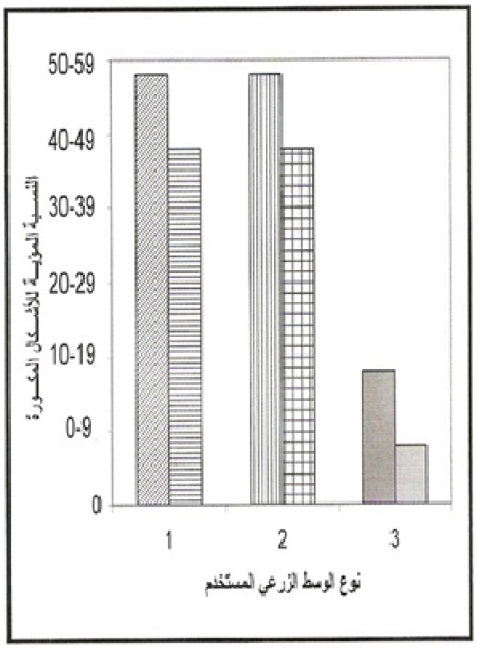
النتائج والمناقشة:-

١- تأثير مكونات الوسط الزرعي في انتاج الاشكال المكورة لجرثومة H. pylori:-

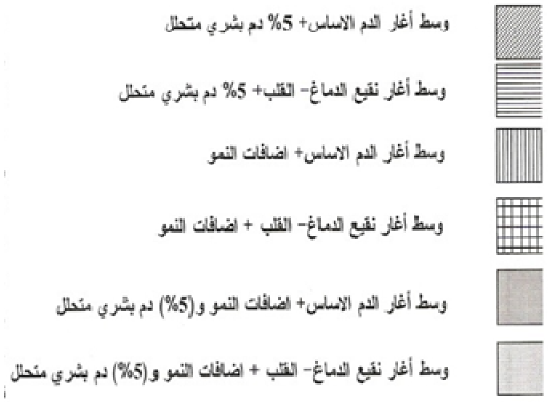
بينت نتائج الدراسة الحالية عدم وجود فروق باستخدام وسط اغار الدم الاساس الحاوي على (٥%) دم بشري متحلل والوسط نفسه الحاوي على اضافات النمو فقط الشكل ١ .؛ فقد اعطى كلا الوسطين اشكالاً مكورة لجرثومة H. pylori بنسبة مئوية تقع بين (٥٠ – ٥٩%) بعد مرور (٤٨) ساعة من حضن الاطباق بدرجة حرارة 37 مْ، اما وسط اغار نقيع الدماغ – القلب الحاوي على (٥%) دم بشري متحلل فقط مع اضافات النمو؛ فقد اعطى نسبة مئوية للاشكال المكورة اقل قياساً مع الوسط اغار الدم الاساس اذ كانت النسبة المئوية (٤٠ – ٤٩%)؛ لذا يفضل معظم الباحثين استخدام وسط اغار نقيع الدماغ – القلب لعزل وتنمية جراثيم H. pylori [11].وعند دراسة مكونات وسط اغار الدم الاساس لوحظ انه

يتكون من Lab – Lemco Powder والببتـون وكلوريـد الصوديوم ومادة الاغار، اما وسط اغار نقيع الدم الـدماغ – القلب فانه يحتوي على المواد جميعها الموجودة فـي وسـط اغار الدم الاساسي الا انه فضلاً عن ذلك يحتوي على مـادة Bacto – Dextrose وقد يكون لتلك المادة تأثير كبير فـي تقليل انتاج الاشكال المكورة؛ وبهذا يمكن الحفاظ على حيوية جرثومــة H. pylori بشـكلها الحلزونـي لمـدة اطـول من الزمن. وقد لاحظ بعض البـاحثين انـه عنـد اضـافة الكلوكوز الى الوسط سيحفز نمو جراثيم الهيليكـوبكتر [4] . عند مقارنة وسط اغار الدم الاساس الحاوي علـى اضـافات النمو والدم مع وسط اغار نقيع الدماغ – القلب الحاوي علـى اضافات النمو والدم ايضاً، ظهر ان الوسط الاول اعطى نسبة مئوية (١٠ – ١٩%) من الاشـكال المكـورة، لـذا يفضـل استخدام وسط اغار نقيع الدماغ – القلب لدراسـة الاشـكال الحلزونية والاشكال المكـورة فـي كثيـر مـن التجـارب المختبرية [12]. عند احتواء الوسط الزرعي على الدم فقط او اضـــافات النمـــو فقـــط فـــان ذلـــك سيؤدي الى ارتفاع في النسبة المئوية للاشكال المكورة عنـد حضن الاطباق بدرجة 37مْ لمدة (٤٨) سـاعة ولكـن عنـد اضافة الدم واضافات النمو معاً فان النسبة المئوية للاشـكال المكورة تكون اقل بكثير مما لو كان الوسط حاوياً فقط علـى الدم او اضافات النمو، لذا فان السبب في انخفـاض النسـب المئوية للاشكال المكورة عند استخدام وسط اغار الدم الاساس واغار نقيع الدماغ – القلب الحاويين على الدم واضافات النمو معاً قياساً مع الاوساط الحاوية على الدم فقط او اضافات النمو فقط يعود الى احتواء الـدم علـى انظيمـات مثـل انظـيم الكاتاليزوبيروكسيديز فضـلاً عـن انظـيم Superoxide dismutase اذ يكون لها تأثير فعال فـي ازالـة مشـتقات الاوكسجين السامة [13] (T oxic Oxygen derivatives). وان احتواء الاوساط الزرعية على اضافات النمو يساعد على الـــــتخلص مـــــن جـــــذور الهيدروكسيل السامة فتحافظ على حيوية جرثومة H. pylori لمدة زمنية اطول [14].

يفضل كثير من الباحثين اضافة مـادة Sodium bisulfate بنسـبة (٠.٠١%) الـى وسـط اغـار نقيع الدماغ – القلب ليحفز نمو جراثيم H. pylori ويساعدها على مقاومة الجفاف وتخمد تأثير الايونـات السـالبة فـوق الاوكسـايد (Superoxide anions) (Coudron & Stratton, 1995).



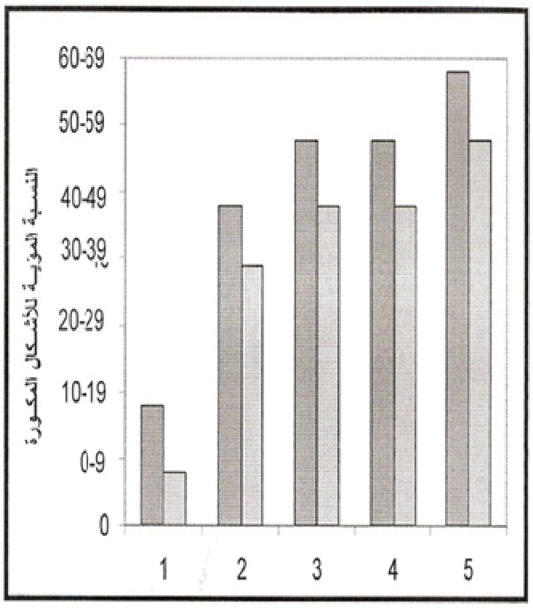
الشكل ١: تأثير مكونات الوسط الزرعي في انتاج الاشكال المكورة لجرثومة H.Pyloi بعد حضن الاطباق بدرجة ٣٧م مدة ٤٨ ساعة



٢- تأثير الضوء والظلام والظـروف الغازيـة فـي انتـاج الاشكال المكورة لجرثومة H. pylori:-

يتوضح من (الشكل ٢). ان الاطباق الحاوية على اغـار الدم الاساس النامية عليه جرثومة H. pylori التي فحصـت مباشرة بعد الحضن بدرجة٣٧ مْ مدة (٤٨) ساعة بدون خزنها وكانت حاوية على نسبة مئوية من الاشكال المكـورة (١٠ – ١٩%)، وعند اختبار النسبة المئوية للاشكال المكورة علـى وسط اغار نقيع الدماغ – القلب ظهر ان نسبتها كانـت (٠ – ٩%)؛ وبهذا فان وسط اغار نقيع الدماغ – القلب يعطي نسبة مئوية من الاشكال المكورة اقل مما هو عليه عنـد اسـتخدام

وسط اغار الدم الاساس؛ لذا فان في دراستنا الحالية فضلنا استخدام وسط اغار نقيع الدماغ – القلب على الاوساط الاخرى لاجراء التجارب المتعلقة بجرثومة H. pylori.
امكن تحديد النسبة المئوية للاشكال المكورة في الاطباق الحاوية على وسط اغار الدم الاساس ووسط اغار نقيع الدماغ – القلب في ظروف مختلفة من الخزن، ووجد ان اعلى نسبة مئوية للاشكال المكورة عند تعريض الاطباق الى الضوء والاوكسجين بنسبة اعلى من (٦%)؛ وبذلك يلاحظ من الشكل 2.
ان النسبة المئوية للاشكال المكورة باستخدام وسط اغار الدم الاساس كانت (٦٠ – ٦٩%)، اما النسبة المئوية للاشكال المكورة نفسها ولكن باستخدام وسط اغار نقيع الدماغ – القلب كانت (٥٠ – ٥٩%). على الرغم من احتواء الوسطين المذكورين على (٥%) دم بشري متحلل واضافات النمو فان النسبة المئوية للاشكال المكورة عالية نتيجة لتعرض الوسط الزرعي الحاوي على جرثومة H.pylori للضوء وتراكيز عالية من الاوكسجين خلال خمسة ايام من الخزن، بسبب تكون جذور الهيدروكسيل وبيروكسيد الهيدروجين في الوسط بوصفها نواتجاً للعمليات الايضية وعمليات الاكسدة الكيميوحيوية، ويلاحظ انه عند حضن الاطباق بدرجة 37م مدة (٢٤) ساعة تم الحصول على الاشكال الحلزونية بنسبة (١٠٠%)، اما عند حضن الاطباق لمدة (٤٨) ساعة فقد ظهرت الاشكال المكورة في الوسط الزرعي نتيجة لقلة المواد الغذائية وتراكم المواد السامة.



الشكل ٢: تأثير الضوء والظلام والظروف الغازية في انتاج الاشكال المكورة لجرثومة H.Pylori

وسط أغار الدم الاساس+ 5% دم بشري متحلل واضافات النمو

وسط أغار نقيع الدماغ- القلب+ 5% دم بشري متحلل واضافات النمو

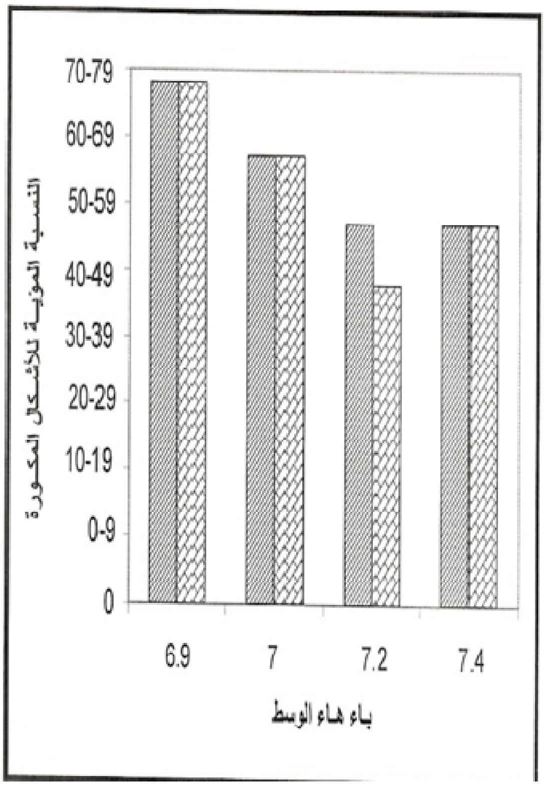
١- فحص الاطباق مباشرة بعد انتهاء مدة الحضانة (٤٨ ساعة بدرجة ٣٧ م) بدون خزن.
٢- جرثومة H. pylori مخزونة في الظلام في ظروف اليفة الهواء القليل لمدة (٥) ايام.
٣- جرثومة H. pylori مخزونة في الظلام في ظروف هوائية لمدة (٥) ايام.
٤- جرثومة H. pylori مخزونة في الضوء في ظروف اليفة الهواء القليل لمدة (٥) ايام.
٥- جرثومة H.pylori مخزونة في الضوء في ظروف هوائية لمدة (٥) ايام.

بلغت النسبة المئوية للاشكال المكورة لجرثومة H. Pylori عند استخدام الاطباق الحاوية على اغار الدم الاساس والمخزونة في الضوء بظروف اليفة الهواء القليل (٥٠-٥٩%)، وتم الحصول على النسبة نفسها عند خزن الاطباق الحاوية على الوسط ذاته في الظلام بظروف هوائية. وباستخدام وسط اغار نقيع الدماغ – القلب بلغت النسبة المئوية للاشكال المكورة (٤٠-٤٩%) عند خزن الاطباق في

الضوء بظروف اليفة الهواء القليل، وامكن الحصول على النسبة المئوية نفسها عند خزن الاطباق الحاوية على جرثومة H. pylori النامية على وسط اغار نقيع الدماغ – القلب في الظلام بظروف هوائية عند دراسة النسبة المئوية للاشكال المكورة لجرثومة H. pylori باستخدام وسط اغار نقيع الدماغ – القلب وخزن الاطباق في الظلام بظروف هوائية بلغت النسبة المئوية (٤٠-٤٩%)، اما عند استخدام وسط اغار نقيع الدماغ – القلب بتوفير الظلام وظروف اليفة الهواء؛ فقد حصل على نسبة تبلغ (٣٠-٣٩%) من الاشكال المكورة؛ لذا عند خزن جرثومة H. pylori يجب عدم تعريضها للضوء والتراكيز العالية من الاوكسجين كي لا تتكون جذور ومشتقات الاوكسجين السامة المؤثرة خاصة في الانواع السالبة لانظيم الكاتاليز (Catalase – Negative Species) والانواع المنتجة لانظيم الكاتاليز بصورة ضعيفة (Catalase – Weak Species) [15]. ويعود هذا الى عدم قدرة جراثيم الهليكوبكتر على معادلة مشتقات الاوكسجين السامة فيضاف الى الوسط الزرعي مركبات الحديد او الدم او الفحم (Charcoal) للتغلب على هذه المشكلة [16]. عند اضافة الماء الى gas generating kit ووضعه في وعاء لا هوائي anaerobic jar ثم غلقه جيداً فان غاز الهيدروجين سيرتبط مع الاوكسجين عند درجة حرارة الغرفة بوجود عامل مساعد (Catalyst) ومن ثم لا يبقى اوكسجين حر يثبط نمو جراثيم الهليكوبكتر فيتوافر بذلك اوكسجين (٥%) داخل الوعاء.

٣- تأثير باء هاء الوسط الزرعي في انتاج الاشكال المكورة لجرثومة H. pylori خلال مدة الخزن:-

من (الشكل ٣) لوحظ ان اعلى نسبة للاشكال المكورة لجرثومة H. pylori يمكن الحصول عليها عند خزن تلك الجراثيم بشكلها الحلزوني لمدة (٥) ايام بدرجة حرارة (٤) م باستخدام وسط اغار نقيع الدماغ – القلب ووسط اغار الدم الاساس في باء هاء ٦.٩؛ اذ بلغت النسبة (٧٠-٧٩%)، اما عند استخدام نفس الاوساط الزرعية، ومدة الخزن، ودرجة الحرارة ولكن باء هاء الاوساط هي ٧؛ عندها بلغت النسبة المئوية للاشكال المكورة (٦٠-٦٩%) وعندما كانت باء هاء الاوساط الزرعية ٧.٤ فان النسبة المئوية بلغت (٥٠-٥٩%). يفضل استخدام وسط اغار نقيع الدماغ – القلب على بقية الاوساط الزرعية التي تستخدم لاجراء التجارب المتعلقة بدراسة الصفات الفيزيائية والكيميائية لجرثومة الهليكوبكتر للمحافظة على الشكل الحلزوني لتلك الجرثومة لمدة اطول من الزمن خلال اوقات الخزن المختلفة. اكدت الدراسات السابقة ان افضل باء هاء لعزل جراثيم الهليكوبكتر هي ٧.٢-٧.٤ بدرجة حرارة ٣٧ مْ، واستخدام باء هاء نفسها عند خزن تلك الجراثيم
(١٩٩٧)



الشكل ٣: تأثير باء هاء الوسط في انتاج الاشكال المكورة لجرثومة H.Pylori بعد خزنها مدة (٥) ايام بدرجة (٤) م

المصادر

1. Warren, J.R. and Marshall, B.J. **1983.** *Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis, Lancet, i: 1273.*
2. Versalovic, J.Fox, J.G. **1999**. and Helicobacter. In: Manual of clinical microbiology, by: Murry, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C. &

Yolken. R.H., 7th edition, (Vol. **1**), ASM press, Washington D.C., pp. 727-738.

3. JavireT.,Margarita,C. and Guillermo, P.**2001**.*IncreasingMultidrug Resistance in Helicobacter pylori strains isolated from children and Adult in mexico, J.Clin.Micro*.,**39**: 2677 -2680.
4. McNulty, C.A.M. and Dent, J.C. **1987** *Rapid identification of Campylobacter pylori by performed enzymes, J. Clin. Microbiol*., **25**: 1683-1686.
5. Owen, R.J. **1998.** Hlicobacter-speciesClassfiacationand Identification,Brit.Med.Bull.,**54**(1):17-30..
6. Mendz, G.L.; Hazell, S.L. and Srinivasan, S. **1995.** Fumarate reductase a target for therapeutic intervention against Helicobacter pylori, Arch. Biochem. Biophys., 321: 15-159. Abstract.
7. Bode, G.; Mauch, F.; Ditschuneit, H. and Malfertheiner, P. **1993.** *Identification ofstructure containing polyphosphateinHelicobacter pylori, J. Gen. Microbio*l., 139: 3029-3033
8. Mohamed Rada Albldiwe **2001**.isolatiation and Identification of from Helicobacter pylori from patient with duodenal ulcer,study bathogenicity and resistance to Antibiotic .AThesis submitted to college of science university of Baghdad as part of the fulfillment oftheM.Sc in *Bio M*.
9. Holt,G.J.,Krieg,N.R.,Staley,G.T.andWilliams, S.T.**1994** .group 2 aerobic/Microaeroehilic,motile,Helical/ Viberoidgram negative Bacteria. IN:Bergeys manual of determination bacteriology , pp.42 -48 19th edition Williams and Wilkins,USA.
10. Cruickshank,R.,Duguid,J.P.,Marmion, B.P.Swain,R.H.A.**1975** .Medical Microbiology ,12the edition ,Vol.**2**.CHurchil Livigston Edinburgh London NewYork .
11. Ghiara, P.; Marchetti, M. and Blasser, M. **1995.** Role of the Helicobacter pylori virulence factor vaculating cytotoxin, CagA and urease in a mouse model of disease., Infect. Immun., **63:** 4154- 4160.
12. Eaton, K.A., Catrenich, C.E., Makin, K.M.and Krakowka, S. **1995**. Virulance of coccoid and bacillary forms of Helicobacter pylori in gnoto - biotic piglets. J. infect. Dis., **17**: 459-462
13. Bolton, F. J., Coates, B. and Hutching, D.N. **1983.** The ability of Campylobacter media supplements to neutralize photochemically induced toxicity
14. Sorenberg, M., Nilsson, M., Hanberger, H. and Nilsson , L.E. **1996**. Morphologic conversion of Helicobacter pylori from bacillary to coccoid form. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **15:** 216- 219.
15. Old,D.C.**1996.**Vibrio,Aeromonas,Plesiomonas,Campylobacter,Arcobacter,Helicobacter,Wolinella.In practical Mediacl Microbiology (ed.) Colel, J.G., Fraser, A.G., Marmion, B.P. and Simmons, A.P., 425-445. Singapoor.
16. Juven, B.J. Rosenthal, I. **1985.** *Effect of free-radical oxygen scavengers on photo chemically generated oxygen toxicity and on the aertolerance of Helicobacter pylori. J. Appl. Bacteriol., 59:415- 419.*