

تعيين افضل وسط ناقل وزرعي للعزل لبكتريا *Helicobacter pylori*

صبا عبد السلام السلطان	صبحي حسين الجبوري
شعبة الأحياء الطبية، فرع التشريح	قسم علوم الحياة
كلية الطب	كلية العلوم
جامعة الموصل	جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2002/8/11 ، تاريخ القبول 2003/7/27)

الملخص

تضمنت عينة الدراسة 295 مراجعاً لوحدة الناضور في مستشفى ابن سينا التعليمي في مدينة الموصل يشكون من الألم في الشرسوف وعسر الهضم والحموضة والقيء والم في البطن وانتفاخ في البطن وحرقة الفؤاد وخروج اسود. إذ تم استئصال الخزعة النسيجية من الاشخاص ضمن عينة الدراسة والراقدين لفحص الناضور ثم نقلها وزرعها للتحري عن الإصابة ببكتريا *Helicobacter pylori* وذلك لتقدير افضل وسط ناقل للخزعة النسيجية من الاوساط الناقلة الاتية: (Stuart's transport medium و Cary-Blair transport medium و Thioglycollate transport medium و Normal saline (%0.9) و Glucose solution (%2) وايضاً لتقدير افضل وسط للعزل الاولي لبكتريا *H. pylori* من الخزعة النسيجية من الاوساط الزرعية الاتية: (Brucella agar و Blood agar و Chocolate agar و Muller- Hinton agar و Eugon agar و Trypcase soy agar و Columbia agar base و Cystein trypcase و Wilkin's Chalgren agar و Brain-Heart Infusion). وتأكد من نتائج هذه الدراسة ان من افضل الاوساط الناقلة للخزعة النسيجية هو Stuart's transport medium، حيث بلغت نسبة نجاح عزل واستنبات بكتريا *H. pylori* باستخدام هذا الوسط 85% وبفرق معنوي على مستوى ($P < 0.001$)، وتأكد ايضاً ان افضل الاوساط الزرعية المستخدمة في العزل الاولي هو وسط Brucella agar بفرق معنوي عالي (اختبار F) وعلى المستويين 0.01-0.05.

Determination of the Best Transport and Culture Media for First Isolation of *Helicobacter pylori*

Saba A. Al-Sultan

Department of Section of Medical Biology,
Anatomy
College of Medicine
Mosul University

Subhi H. Al-Jubouri

Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

The study sample consisted of 295 patients attending endoscopy unit of Ibn-Sena teaching hospital in Mosul. These patients were complaining from epigastric pain, dyspepsia, acidity, vomiting, flatulence and melena. Biopsies were taken from patients undergoing endoscopy and transported, cultured for *Helicobacter pylori* identification to evaluate the best transporting medium, listed as follows: (Stuart's transport medium, Cary-Blair transport medium, Thioglycollate transport medium, Normal saline (0.9%) and Glucose solution (2%)) and evaluate the best culture medium for first isolating, listed as follows: (Brucella agar, Blood agar, Chocolate agar, Muller-Hinton agar, Eugon agar, Trypcase-soy agar, Colombia agar base, Cystein trypcase agar, Wilkin's chalgren agar and Brain-Heart Infusion agar). It was found that the best media for biopsy transporting, the Stuart's transport medium. Its proportion in the term of isolation and growth was 85% with a statistically significant difference ($P < 0.001$). Whereas Brucella agar found to be the best medium for primary isolation with a statistically significant difference of 0.01 and 0.05 using F-test.

المقدمة

الأوساط الزرعيه الخاصه بعزل واستنبتات بكتريا *Helicobacter pylori* غير متوفرة مثل وسط (Bio Merieux pylori) وفضلا عن هذا الوسط تحتاج هذه البكتريا لنموها أوساطا زرعية أساسية معقدة Complex basal medium (أما صلبة أو سائلة) بإضافة بعض المغذيات ومعززات النمو Supplements مثل الدم (Whole blood)، المصل (Serum)، الهيم (Heme)، الفحم النباتي (Charcoal) ومستحلب صفار البيض (Egg yolk emulsion) (Ansorg et al., 1991). والعزل الأولي First isolation لبكتريا *H. pylori* يحتاج الى ظروف قلته في الهواء (5% O₂، 7% CO₂، 80% N₂، 8% H₂) وإضافة خلط من المضادات الحيائية (Polymyxin B، Trimethoprim، Vancomycin) لتثبيط نمو البكتريا الأخرى وهذا الخليط يسمى Skirrow's وتوفير رطوبه عاليه بحدود (95-98%) ودرجة حرارة تحضين بين (30-37)°م حيث انه لا تنمو بدرجة 25°م ولا في 42°م كما في انواع جنس *Campylobacter*. (Goodwin et al., 1985).

أن بعض سلالات هذه البكتريا تصبح أكثر مقاومه للأوكسجين بعد الزرع الأولي وعند الزرع الثانوي Subculture حيث انها تنمو فقط بوجود 10% من CO₂ ولم يحصل نجاح في نمو هذه البكتريا لا في العزل الأولي ولا في الزرع الثانوي عند ظروف التحضين اللاهوائية (Xia et al., 1994 b). ومن الجدير بالذكر بأن *H. pylori* بكتريا صعبة الارضاء Fastidious فأنها قد لا تنمو رغم توفر كل متطلبات النمو المذكوره أعلاه وكثيرا ماتسمى بالبكتريا العديمة النمو Uncultured bacteria واحيانا ماتسمى بالجرثومه المتقلبه Fickle germ (Cellini et al., 1994). ومن الأمور المهمه والمتعلقه بنجاح زراعة واستنبات بكتريا *H. pylori* هو عملية نقل الخزعه النسيجية من وحدة تنظيف الجهاز الهضمي الى المختبر فيها يمكن الحفاظ على حيويه بكتريا *H. pylori* في حالة تواجدها في النسيج المستأصل وايضاً يمكن القضاء عليها عند عدم الاعتناء في نقل الخزعة، والاعتناء يتمثل في اختيار وسط ناقل مناسب يحافظ على حيوية البكتريا من اجل التمكن من زراعتها واستنباتها، وايضاً درجة الحرارة في انشاء فترة نقل الخزعة النسيجية والتي يفضل ان لا تتجاوز (3-4) °م (Massuda and Boyd, 1996). وبهذا فإن الهدف من هذه الدراسه تركز في أمرين أولهما هو تقدير افضل وسط ناقل للخزعه النسيجية المأخوذه من معدة الإنسان والثاني هو تقدير افضل وسط زرعي لاستنبات بكتريا *H. pylori*.

المواد وطرائق العمل

جمعت الخزع النسيجية Biopsies من 295 مراجع يعانون من اعراض لها علاقه بأمراض الجهاز الهضمي. إذ أستأصلت الخزع من منطقة غار المعده Gastric antrum عند إجراء عملية تنظيف الجهاز الهضمي العلوي Upper gastrointestinal endoscopy في وحدة تنظيف الجهاز الهضمي في مستشفى ابن سينا العام في الموصل بواسطة المسلقط الخاص بجهاز الناظور (من شركة Olympus CLE 10) من قبل الطبيب المختص.

ونقل الخزعه النسيجية تم بوضع الخزعه في الوسط الناقل بعد أستئصالها مباشرة، ولغرض تقدير افضل وسط ناقل تم في هذه الدراسه استخدام خمسة أنواع من الأوساط الناقله وهي كالتالي:
(Oxoid), Cary-Blair transport medium (Oxoid), Stuart's transport medium (Oxoid)
Thioglycollate transport medium (0.9 % Normal Saline) وأخيراً (2 % Glucose Solution).

وتم اختيار الأوساط الناقله أعلاه بنقل 20 خزعه نسيجية لكل نوع من الأوساط أعلاه وذلك لتقدير أفضلها في الحفاظ على بكتريا *H. pylori* والذي تم تقديره بأجراء اختبار اليوريز السريع على الخزعه النسيجية والفحص المجهرى المباشر للمزيج الخزعي النسيجي وزراعة الخزعه النسيجية. حيث تم تحضير المزيج الخزعي النسيجي بنقل الخزعه النسيجية من الوسط الناقل الى ظرف معقم خاص بجهاز

Stomaker (من شركة SEWARD MEDICAL UAC HOUSE الأنكليزية) حاوي على 1.5 سم³ من المحلول الملحي الفسلي المعقم، حيث تعامل الخزعة النسيجية بهذا الجهاز مدة 5 دقائق لكي تتم مجانسة الخزعة بعد هضمها بواسطة هذا الجهاز، ومن ثم إجراء الاختبارات التشخيصية على هذا المزيج، ومنها إجراء الفحص المجهرى المباشر والذي تم بتثبيت اغشيه من هذا المزيج على شرائح زجاجيه وصبغها بصبغة كرام لملاحظة شكل البكتريا داخل النسيج قبل زراعتها على الأوساط الزرعيه وايضاً مقارنة نتائج الفحص المجهرى مع نتائج زراعة واستنابت بكتريا *H. pylori*.

وأختبار اليوريز تم بتلقيح وسط Urea agar slant بـ 100 مايكروليتر من المزيج الخزعي النسيجي (Lee and Megraud, 1996). وأن من اهم الأختبارات في هذه الدراسه هو زراعة واستنابت بكتريا *H. pylori* ولغرض ذلك استخدمت الأوساط الزرعيه التاليه: وسط Brucella agar (Oxoid) والذي حضر باضافة (7-5%) دم انسان او اغنام، وسط Colombia agar base (oxoid) والذي حضر منه Chcolate agar، وسط Brain-Heart Infusion agar والذي حضر باضافة المواد الأئيه: 2% من مادة الفحم النباتي و 1% من مستخلص الخميره و 0.04% من Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) و (7-5%) دم خيول، وسط Wilkin's Chalgren والذي تم تحضيره بالأعتماد على طريقه (Wilkin's and Chalgren, 1993)، اما الأوساط الخمسه التاليه: Hinton agar (Oxoid)-Muller و eugon agar (Bio Merieux) و cystein tryptic agar (Bio Merieux) و Nutrient agar (Oxoid) ، حضر منها Blood agar باضافة (7-5%) دم اغنام، وجميع الأوساط المحضره أعلاه أضيف اليها خليط المضادات الحيائيه Skirrow's وذلك لغرض عزل البكتريا من الخزعه النسيجيه. واستنابت بكتريا *H. pylori* تم بتلقيح الأوساط الزرعيه المذكوره أعلاه بـ 100 مايكروليتر من المزيج الخزعي النسيجي بعدها حضنت الأوساط الزرعيه بالمرطبان (Jar) بدرجة 37°م مع عدة تحرير الغاز Gas generating kit الخاصه بالبكتريا المحبه للهواء القليل لتوفير (5%) من غاز O₂ و (10%) من غاز CO₂ مع وضع قنينه زجاجيه مفتوحه محتويه على الماء لتوفير الرطوبه اللازمه بين (95-98%)، وقرأت النتيجة بعد مرور (5-7) ايام من التحضين. وبعدها تم إجراء الأختبارات الشكايه والكيموحيائيه (Lee and Megraud, 1996).

النتائج

تقدير أفضل وسط ناقل:

في بداية هذه الدراسه تم اختيار خمسة أنواع من الأوساط الناقله الهدف من استخدامها هو تقدير أفضل وسط ناقل للخزعه النسيجيه ومنها وسط Stuart's transport medium والذي استخدمه الباحث Glupczynski في نقل الخزعه النسيجيه وأول من حضر هذا الوسط واستخدمه هو الباحث Stuart's عام 1959 لنقل العينات الحاويه على الكائنات ذات المتطلبات التغذويه المتعدده

(Lee and Megraud, 1996). والوسط الثاني الذي تم اختياره لتقدير أفضل وسط ناقل هو Cary-Blair transport medium، وأول من حضره وأستخدمه الباحثان Cary و Blair عام 1964. والوسط الثالث هو وسط Thioglycollate transport medium. ومن الجدير بالملاحظة أنه لا توجد أي دراسته تشير إلى استخدام وسط Cary-Blair أو وسط Thioglycollate في نقل الخزعة النسيجية وفضلاً عن هذه الأوساط تم استخدام Normal Saline و Glucose Solution (Goodwin et al., 1985).

فأظهرت نتائج هذه الدراسة وكما مبين في الجدول (1) أن وسط Stuart's هو أفضل وسط ناقل للخزعة النسيجية بدرجة حرارة لا تتجاوز 3 °م ويفرق معنوي على مستوى ($P < 0.001$) وبليسه وسط Cary-Blair بفرق معنوي على مستوى ($P < 0.01$) أما الأوساط الثلاثة الباقية، لم يكن لأستخدامهم تأثيراً معنوياً مقارنة مع كل من الوسطين الناقلين Stuart's و Cary-Blair.

الجدول 1: علاقة الأوساط الناقلة المختلفة مع كفاءة عزل بكتريا *H. pylori*.

الوسط الناقل	عدد الخزعات	نتيجة اختبار اليوريز		نتيجة الفحص المجهرى المباشر		نتائج زراعة واستنبتات البكتريا		مستوى P-
		% -	% +	% -	% +	% -	% +	
Stuart's transport medium	20	10	90	40	60	15	85	< 0.001
Cary-Blair transport medium	20	5	95	45	55	20	80	< 0.01
Thioglycollate transport medium	20	20	80	35	65	60	40	غير معنوي
Glucose solution (2%)	20	15	85	50	50	60	40	غير معنوي
Normal saline (0.9%)	20	10	90	25	75	65	35	غير معنوي

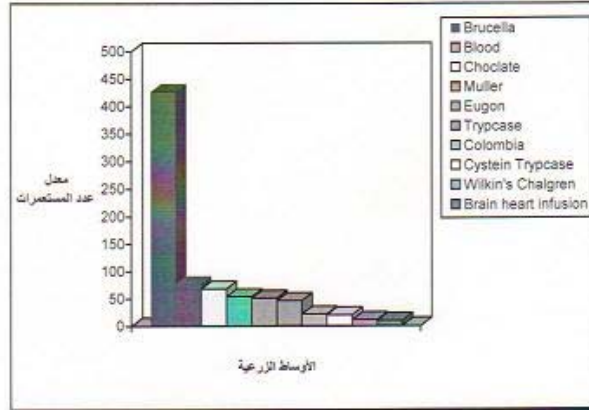
تقدير أفضل وسط زرعي للعزل الأولي لبكتريا *H. pylori* من الخزعة النسيجية:

في هذه الدراسة تم استخدام 10 أنواع من الأوساط الزرعية لمقارنة كفاءتها في العزل الأولي لبكتريا *H. pylori* وبالنتيجة تقدير افضل وسط زرعي لاستنبتاتها. فنتبين من نتائج هذه الدراسة وكما في الشكل (1) أن افضل الأوساط الزرعية المستخدمة في عزل البكتريا هو وسط Brucella agar بفرق معنوي عال (أختبار F) وعلى المستويين 0.05 و 0.01.

المناقشة

تقدير أفضل وسط ناقل:

في هذه الدراسة قد يعزى فشل وسط Thioglycollate في الحفاظ على حيوية بكتريا *H. pylori* هو لتوفيره ظروف لاهوائية نامه وهذا غير ملائم للبكتريا طبقاً لما أكده الباحث Xia بأن بكتريا *H. pylori* لاتتمو اطلاقاً في غياب الأوكسجين أي في الظروف اللاهوائية (Xia et al., 1994b).



الشكل 1: علاقة الأوساط الزرعيه المختلفه مع كفاءه عزل وأستنبات بكتريا *H. pylori*

أما بالنسبه لفشل Glucose Solution و Normal Saline في الحفاظ على حيوية بكتريا *H. pylori* قد يعزى لكونها محاليل لها القابليه على استيعاب نسبة من الأوكسجين بما يزيد عن 5% والذي لاتتحمله البكتريا وهذا ما أكده كل من Jones و Goodwin و Marshall (Jones et al., 1984;) (Goodwin et al., 1985; Marshall, 1994).

وفي هذه الدراسة تم تقدير أفضل وسط ناقل بمقارنة نتائج زراعة وأستنبات بكتريا *H. pylori* مع نتائج الفحص المجهرى المباشر واختبار اليوريز السريع لكل مجموعه من الخزع النسيجي للتأكد من وجود البكتريا في هذه الخزع. وبهذه النتائج تم اعتماد وسط Stuart's كوسط ناقل للخزعه النسيجي، وقد يعود تفوقه لما يتميز به من انخفاض في مستوى جهد الأوكسده والأختزال بما يلائم بكتريا *H. pylori* (Gerald et al., 1996).

تقدير أفضل وسط زرعي للعزل الأولي لبكتريا *H. pylori* من الخزعة النسيجية:

عند العزل الأولي لبكتريا *H. pylori* يفضل استخدام أكثر من نوع واحد من الأوساط الزرعيه وهذا ما أشار اليه الباحث Xia وذلك للحصول على معدل استنبات أكبر (Xia et al., 1994a) وهذا لأنه في بعض الأحيان حتى أفضل الأوساط الزرعيه المستخدمه لهذا الغرض يخفق في عزلها وقد يعود الى الاختلاف في المتطلبات بين سلالات هذه البكتريا وأيضا لكونها بكتريا صعبة الأرضاء ومتقلبه في أيضا (Cellini, 1994).

ومن الجدير بالملاحظه بأن حجم المستعمرات يختلف من وسط لآخر فكان حجمها طبيعيا بين (0.5-1) ملم في كل من الأوساط Brucella agar و Blood agar و Chocolate agar بينما كانت المستعمرات أصغر حجما في وسط Muller -Hinton agar وهذا أيضا ما أكده الباحث Taylor ولا حظ أيضا بأن معدل نمو بكتريا *H. pylori* على وسط Blood agar أكبر من معدل نموها على وسط Chocolate agar (Taylor, 1988) وهذا أيضا تحقق في نتائج هذه الدراسه، ولم يكن مهما دراسة شكل وحجم المستعمرات في الأوساط الزرعيه المتبقية وذلك لأن معدل نموها لم يكن بالمستوى المطلوب. وبالرغم من كل المصاعب والتعقيدات المصاحبه لعزل واستنبات بكتريا *H. pylori* من الخزع النسيجيه، تبقى هذه الطريقه ليست الطريقه الأساسيه في تشخيص الأصابه بالبكتريا مقارنة مع الطرائق المناعيه وأختبار اليوريز السريع ولكن أهميتها تتحدد في إجراء الأختبارات الكيموحياتيه وأختبار الحساسيه للمضادات الحياتيه وأيضا بواسطتها يمكن تحديد فشل أو نجاح العلاج بالاعتماد على نتيجة زراعة الخزع النسيجيه بعد الأنتهاء من فترة العلاج.

المصادر الاجنبية

- Ansorg, R., Von-Recklinghausen, G., Pomarius, R. and Schmidt, E.N., 1991. Evaluation of Techniques for Isolation, Sub-Cultivation, and Preservation of *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol., Vol.29, No. 1, pp.51-53.
- Cellini, L., Allocati, N., Campli, E. and Dainelli, B., 1994. *Helicobacter pylori*: Fickle Germ. Microbiol. Immunol., Vol.38, No. 1, pp.25-30.
- Gerald, J.C., Barrie, P.M., Andrew, G.F. and Anthony, S., 1996. Makie and McCartney: Practical Medical Microbiology. Churchill Livingstone, USA, 14th ed., chap. 24, pp.425-448.
- Goodwin, C.S., Blincow, E.D., Warren, J.R., Waters, T.E. and Sanderson, C.R., 1985. Evaluation of Cultural Techniques for Isolating *Campylobacter pyloridis* from Endoscopic Biopsies of Gastric Mucosa. J. Clin. Pathol., Vol.38, pp.1127-1131.
- Jones, D.M., Lessells, A.M. and Eldridge, J., 1984. *Campylobacter*-Like Organisms on Gastric Mucosa; Culture, Histological and Serological Studies. J. Clin. Pathol., Vol.37, pp.1002-1006.

- Lee, A. and Megraaaaud, F., 1996. *Helicobacter pylori* Techniques for Clinical Diagnosis, Basic Research. Published by WB Saunders Company Lyd. Philadelphia, USA.
- Marshall, B.J., 1994. *Helicobacter pylori* Am. J. Gastroenterol., Vol.89, No. 8, pp.116-128.
- Massuda, H.K. and Boyd, E.J.S., 1996. Who Should Undergo Testing for *Helicobacter pylori*. Am. J. Gastroenterol., Vol. 91, No. 6, pp.1070-1071.
- Taylor, D.E., 1988. *Campylobacter pylori* Isolation, Characterization and Association with Chronic Gastritis and Ulcer. Culture, Vol. 9, No. 1.
- Wilkins, T.D. and Chalgren, S., 1993. Production Formation: Dehydrated Culture Media and Supplement. HI-MEDIA, India, 2nd ed., part B, pp.159-180.
- Xia, H.X., Keane, C.T., Chen, J., Zhang, J. and Walsh, E.J., 1994a. Transportation of *Helicobacter pylori* Cultures by Optimal System. J. Clin. Microbiol., Vol. 32, No. 12, pp.3075-3077.
- Xia, H.X., Keane, C.T. and Omorain, C.A., 1994b. Culture of *Helicobacter pylori* Under Aerobic on Solid Media. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., Vol.13, No. 5, pp.406-409.