اختبـار التـلازن الدموي لبكتريـا *Helicobacter pylori*

صبا عبد السلام حامد السلطان* ***صبحـي حسين خلف الجبوري*****

استلام البحث 13، نيسان، 2014
قبول النشر 14، ايلول، 2014

الخلاصـة:
ثلاثين عزلة سريرية من بكتريا ***Helicobacter pylori*** حصل عليها من المرضى الخاضعين لفحص النـاظور في مستشفى ابن سينا التعليمي في الموصل والذين يشكون من الألم في الشرسوف وعسر الهضم والحموضة والقيء والم في البطن وانتفاخ البطن وحرقة الفؤاد وخروج اسود اللون. واستخدمت عزلات بكتريا ***H.pylori*** لإجراء اختبار التلازن الدموي والذي يتضمن تحديد التراكيب السكرية المقترنة على أسطح كريات الدم الحمراء . وفي هذه الدراسة تم استخدام كريات الدم الحمـراء للأغنام لكونها تشبه في مكوناتها السطحية للخلايا الطلائية للإنسان .
وبرهنت نتائج هذه الدراسة باستخدام اختبـار التلازن الدموي من قابلية بكتريا ***H.pylori*** على الالتصاق على مستقبلات متخصصة على أسطح كريات الدم الحمراء للأغنام وهذا يعني وبعبارة اخرى قابليتها على الالتصاق على أسطح الخلايا الطلائية للإنسان والتي تعد الخطوة الأولى في إمراضيه هذه البكتريا .

الكلمات المفتاحية : التـلازن الدموي:*Helicobacter pylori*

المقدمـة:
بكتريا *Helicobacter pylori* هي بكتريا سالبة لصبغة كرام ، شكلها حلزوني ، وتمتلك الاسواط التـي تجعلهـا سـباحة مـاهرة ومقاومـة للحركـة التموجية للمعدة وايضا تساعدها على التغلغل بداخل الانسجة.
وان العدوى بهذه البكتريا عادة تحدث في مرحلة الطفولـة عـن طريـق التلـوث البـرازي ، وتشـير التقارير الوبائية ان مابين ثلث سكان العالم ونصفهم يحملـون بكتريـا *H.pylori* فـي مخاطيـة المعـدة . واثبتت الدراسات بأن الاصابة ببكتريا *H.pylori* تحصل في العمر المبكر من حياة الفرد [1]، ففي الدول النامية مابين (60-70%) من الاطفال يكون الاختبـار المصـلي لـديهم ايجابيـا فـي سـن العاشـرة بسبب ان العدوى بهذه البكتريا تحصل في العشر سـنوات الاولـى مـن حيـاة الفـرد ، امـا فـي البلـدان المتقدمـة كمـا فـي الولايـات المتحدة واوربـا يندر ان يصـاب الاطفـال بهـذه البكتريـا [2] . ومـن هـذا نلاحظ ان زيادة معدل الاصابه بهذه البكتريا مرتبط بزيادة التدني في الظروف الاقتصادية والاجتماعية.
وطرائـق تشـخيص الاصـابة ببكتريـا *H. pylori* مقسمة الـى نـوعين مـن الاختبـارات بالاعتمـاد علـى وجـود او عـدم وجـود الخزعـة النسـيجية وهـي كمـا يلي:
اولا : الاختبـارات المعتمـدة علـى وجـود الخزعـة النسيجية Invasive methods:
- الاختبـــارات النســـيجية المرضـــية Histopathology.
- زراعة البكتريا على الاوساط الزرعية.
- اختبار اليوريز السريع Rapid urease test.
- اختبار البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR).

ثانيا: الاختبارات التـي لاتعتمد علـى وجـود الخزعـة النسيجية Non invasive methods
- اختبـار الـدم للتحـري عن وجـود الاجسـام المضادة Antibodies للبكتريا.
- فحـص الخـروج للتحـري عـن وجـود البكتريا وايضا الاجسام المضادة.
- اختبـار اليوريـا التنفسـي Urea breath test.[3]

ان اول مـن وضـع أسـس اختبـار الـتلازن الـدموي العـالم Hirst عـام 1941 ، وخاصـية الـتلازن الـدموي تتميـز بهـا العديـد مـن الكائنـات المجهرية وذلك بقابليتها على الالتصاق على سطح كريتـي دم حمـراء فـي آن واحـد . ويمكـن إجـراء اختبـار الـتلازن الـدموي مختبريـاً فـي الانابيـب او بحفر البولي ستيرين حيث تتكون شبكة من كريات الدم الحمراء في قعر الأنبوب او الحفر [4] .
من الخطوات الاولى في إمراضيه بكتريا *H. pylori* قابليتهـا علـى الالتصـاق علـى اسطح الخلايا الطلائية للمعدة[5]، ومما تجدر الاشارة اليه هـو ان الخلايـا الطلائيـة تشـترك مـع كريـات الـدم الحمـراء فـي امـتلاك التراكيـب السـكرية المقترنـة (Glyco conjugate structures) ولهذا السبب اصبح من المهم استخدام اختبـار الـتلازن الـدموي للتأكـد مـن وجـود عوامـل الالتصـاق علـى اسـطح الخلايـا البكتيريـة والتـي تسـمى بالعوامـل الملزنـة

*شعبة الاحياء الطبية /فرع التشريح/ كلية طب نينوى / جامعة الموصل
**كلية التمريض / جامعة الموصل

الدموية (Haemagglutinin) والتي لها القابلية على الالتصاق بالتراكيب السكرية المقترنة على اسطح كريات الدم الحمراء ، وبهذا يصبح من السهل فهم عملية استيطان وتكوين المستعمرات لبكتريا *H.pylori* على اسطح الخلايا الطلائية[6] .

وتستخدم كريات الدم الحمراء في هذا الاختبار لتوفرها وسهولة استخدامها مقارنة مع المزارع النسيجية Tissue culture وايضاً لقابلية الاحتفاظ بها لفترة ما بين اسبوع الى اسبوعين بدرجة حرارة 4° م ومما تجدر الاشارة اليه ان مختلف كريات الدم الحمراء للحيوانات تظهر عددا كبيرا من مختلف البروتينات السكرية (Glycoproteins) والدهون السكرية (Glycolipids) والتي يمكن الاستفادة منها في تشخيص وتحديد العديد من السلالات البكتيرية[7] .

فالهدف من هذه الدراسة هو اثبات الفرضية حول قابلية التصاق بكتريا *H.pylori* على اسطح الخلايا الطلائية والتي بالنتيجة تسهل عملية الاصابة واستيطان نسيج المعدة وهذا من خلال اجراء اختبار التلازن الدموي بالاستفادة من وجود التراكيب السكرية المقترنة المتشابه بين الخلايا الطلائية وكريات الدم الحمراء.

المواد وطرائق العمل:

المحاليل والمواد الخاصة باختبار التلازن الدموي Haemagglutination test

-محلول الـسيفر Alsever's المحضر من :

كلوكوز	24.6غم
سترات الصوديوم	9.6غم
كلوريد الصوديوم	5.04غم
ماء مقطر	1200سم^3

اذيبت المواد تباعاً في الماء المقطر وضبط الأس الهيدروجيني الى6.1 [9,8]

– معلق كريات الدم الحمراء للأغنام Sheep erythrocyte suspension

1- الخطوة الاولى ولغرض حفظ دم الاغنام لحين استخدامه تم مزج حجم من دم الاغنام مع حجم من محلول السيفر [1: 1] وحفظ المزيج بدرجة4°م لفترة بين 6ايام الى ثلاثة اسابيع .

2- عند استخدام محلول كريات الدم الحمراء للأغنام ، غسلت مرتين بدارئ ملح الفوسفيت الفسيولوجي Phosphate buffer saline (PBS) (pH=7.2) باستخدام الطرد المركزي (5000 دورة / دقيقة) لمدة عشر دقائق .

3- حضر محلول كريات الدم الحمراء للأغنام لفحص التلازن الدموي بتركيز 1% بدارئ ملح الفوسفيت الفسيولوجي [10,8]

- المعلق البكتيري Bacterial suspension

حضر كالاتي :

1- زراعة الخزعة النسيجية:

تم زراعة الخزعة النسيجية بعد استئصالها من منطقة غار المعدة اثناء عملية تنظير الجهاز الهضمي العلوي (المرئ ، المعدة ، الاثني عشري) Esophago-gastro-duodenoscopy (في وحدة تنظير الجهاز الهضمي في مستشفى ابن سينا التعليمي) بواسطة الملقط الخاص بجهاز الناظور (من شركة Olympus وموديل Olympus CLE 10) ووضعها في الوسط الناقل Oxoid stuart's transport medium وبدرجة حرارة لا تزيد عن (2 - 3) °م وخلال مدة لا تزيد عن الساعتين ، تم تحضير المزيج الخزعي النسيجي في هذه الدراسة بوضع الخزعة النسيجية في 1.5 سم^3 من دارئ ملح الفوسفيت الفسيولوجي (PBS) (0.9 %) المعقم الموجود في ظرف معقم خاص بجهاز Stomaker (من شركة RD MEDICAL UAC HOUSE الإنكليزية) حيث تعامل الخزعة النسيجية بهذا الجهاز مدة 5 دقائق للحصول إلى المزيج الخزعي النسيجي ، ومنه أخذ 100 مايكروليتر وفرشه على وسط Oxoid Brucella agar المضاف له دم أغنام بنسبة 10 % وبعدها تم التحضين بالمرطبان (Jar) بدرجة حرارة 37 °م مع وضع عدة تحرير الغاز (Gas generating kit) لتوفير 5 % من غاز O_2 و 10 % من غاز CO_2 ، ومن الأمور المهمة هو توفير رطوبة عالية تقدر بـ98 % وذلك بوضع قنينة زجاجية مفتوحة محتوية على الماء بداخل المرطبان أثناء فترة التحضين التي تستغرق 5 – 7 أيام ، بالاعتماد على طريقة [10] , . وعدد الخزع النسيجية المستأصلة 54 خزعة .

2- جمعت المستعمرات البكتيرية لكل عزلة بدارئ ملح الفوسفيت الفسيولوجي ومن ثم غسلت به مرتين بواسطة الطرد المركزي (5000 دورة / دقيقة) لمدة عشر دقائق .

3- تم تحضير معلق بكتيري بدارئ ملح الفوسفيت الفسيولوجي بتركيز (3 x 10^9) خلية بكتيريه/ سم^3 بالاعتماد على المقارنة بانابيب ماكفرلاند القياسية Macfarland standards لتقدير عدد الخلايا البكتيرية [4].

– طريقة اختبار التلازن الدموي

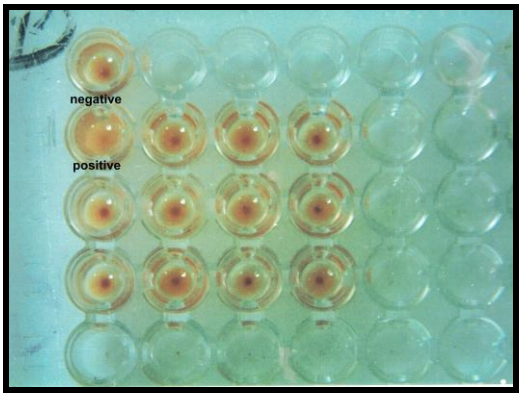
1- اضيف 50 مايكرولتر من دارئ ملح الفوسفيت الفسيولوجي (PBS) (pH =7.2) لكل حفرة من صفيحة البولي ستيرين ابتداء من الحفرة رقم 2 والى الحفرة رقم 12 .

2- اضيف 50 مايكرولتر من محلول البكتريا للحفرتين رقم 1 و 2 فقط (الحفرة رقم 1 عينة سيطرة موجبة) مع المزج بهدوء باستخدام المايكروبايبيت .

3- عمل تخافيف للخلايا البكتيرية وذلك بنقل 50 مايكرولتر من معلق البكتريا ابتداء من الحفرة رقم 2 والى الحفرة رقم 12 .
4- اضيف 50 مايكرولتر من معلق كريات الدم الحمراء للأغنام مع المزج في كل حفرة بهدوء باستخدام المايكروبايبيت .
5- عمل اختبار سيطرة سالب باضافة 50 مايكرولتر من دارئ ملح الفوسفيت الفسيولوجي (PBS) مضافا له 50 مايكرولتر من معلق كريات الدم الحمراء للأغنام وبدون اضافة معلق البكتريا للتأكد من عدم تلازن كريات الدم الحمراء بعدم وجود البكتريا .
6- قرأت النتائج بعد تركها لمدة ساعتين بدرجة حرارة الغرفة .

النتائج والمناقشة:

تم عزل واستنبات بكتريا ***H.pylori*** من 30 خزعة نسيجية من اصل 54 خزعة نسيجية مستأصلة من منطقة غار المعدة اثناء تنظير الجهاز الهضمي اي ان نسبة عزلها 66.67% .
وان التصاق بكتريا ***H. pylori*** بالخلايا الطلائية للطبقة المخاطية يعد الخطوة الاولى من خطوات البكتريا في استيطان وتكوين المستعمرات على نسيج المعدة [11] . وللتشابه الموجود بين اسطح الخلايا الطلائية وكريات الدم الحمراء للحيوانات بما فيها الأغنام من حيث امتلاكها تراكيب مقترنة كما اشارت اليه الباحثة[12] قد تم الاعتماد بهذه الدراسة على استخدام كريات الدم الحمراء للأغنام في اختبار التلازن الدموي للكشف عن قابلية البكتريا على الالتصاق بها وبعد مرور ساعتين من اجراء الاختبار ظهرت نتيجة التلازن الدموي الموجبة كما في الصورة رقم (1) في الحفرة المؤشرة بالإختبار الموجب Positive (اي بتركيز (3×10^9) خلية بكتيريه / سم^3). إذ اظهرت جميع عزلات بكتريا ***H. pylori*** المعزوله من الخزع النسيجية في هذه الدراسة نتيجة ايجابية لفحص التلازن الدموي عند التركيز (3×10^9) خلية بكتيريه / سم^3.



صورة (1) اختبار التلازن الدموي *

* (ومدة الاختبار ساعتين في خارج الجسم الحي *Ex-vivo* وليس بالضرورة ان تكون نفس المدة التي تطلبها البكتريا للالتصاق على اسطح الخلايا الطلائية بداخل الكائن الحي اي ان فترة الاختبار لاتمثل فترة الحضانة)

وبالاعتماد على نتائج الدراسات التي قام بها كل من الباحثين Marshal و Piotrowski وجماعته والتي اكدت ان التراكيب المقترنة التي تمتلكها كل من الخلايا الطلائية وكريات الدم الحمراء للأغنام هي عبارة عن مستقبلات خاصة لالتصاق البكتريا عن طريق امتلاكها بعض المكونات على اسطحها [14,13]
وبالاعتماد على نوعية هذه المكونات تم تقسيم سلالات بكتريا *H. pylori* الى مجموعتين :
المجموعة الاولى : والتي تضم سلالات تعطي تلازنا دمويا قويا (Strong haemagglutinnation) وهذا يعود الى امتلاك البكتريا على سطحها مركبات مثل : [Neu AC(2-3) GA1] N-acetyl pyranosyl neuraminyl (2-3) galacto ومركبات اخرى محتوية على حامض السيالك (Sialic acid) [8] .
المجموعة الثانية : والتي تضم السلالات التي تعطي تلازنا دمويا ضعيفاً (weak haemagglutination) والتي لم يحدد الى الان المكونات التي تمتلكها البكتريا في احداث هذا النوع من التلازن . ومن الجدير بالذكر انها لا تمتلك المكونات التي تمتلكها المجموعة الاولى، وتم كشف ذلك عن طريق اجراء اختبار التلازن الدموي المثبط باضافة مواد تنافس المكونات الموجودة على اسطح البكتريا في الارتباط مع الخلايا الطلائية وكريات الدم الحمراء مثل : N-acetyl neuraminyl lactose (NAN/ac) , Fetuin و Orosomucoid ، عندها لوحظ تثبيط اختبار التلازن الدموي لسلالات المجموعة الاولى ولم يحصل تثبيط للاختبار عند استخدام سلالات المجموعة الثانية وهذا دليل على ان سلالات

المجموعة الثانية لا تمتلك المكونات التي تمتلكها سلالات المجموعة الاولى [8] .

وهذا الاختلاف في المركبات لسلالات المجموعة الثانية قد لا تناسبه المستقبلات الموجودة على اسطح كريات الدم الحمراء للأغنام والذي يؤدي الى ضعف في التلازن الدموي وبالنتيجة قد يؤدي الى اختلاف في طريقة ارتباطها بالخلايا الطلائية وخلايا الجسم الاخرى ، وهذا يدفعنا الى التفكير بان هذا الاختلاف في المكونات قد يكون تكيف (Adaptation) والذي قد يحصل في بعض السلالات بتأثير ظروف معينة ليعطي صورة جديدة من صور ضراوة بكتريا *H. pylori* باعتبارها من الجراثيم المتقلبة [15]والتي قد تساعدها في التهرب من الدفاعات المناعية ليتسنى لها الارتباط بخلايا الطبقة المخاطية عند الاصابة بطريقة غير محفزة للاستجابة المناعية .

ومما تجدر الاشارة اليه فقد تأكدت هذه الحقيقة من خلال هذه الدراسة باختلاف بين سلالات بكتريا *H. pylori* قيد الدراسة في اعطاء نتيجة التلازن الدموي القوي والضعيف اذ تم ملاحظة ذلك اثناء قراءة النتائج ، لكن لم يتم التفريق بين عزلات بكتريا *H. pylori* على اساس التلازن الدموي القوي والضعيف لانه كان الهدف من هذه الدراسة فقط هو اثبات الفرضية حول قابلية التصاق بكتريا *H.pylori* على اسطح الخلايا الطلائية والتي بالنتيجة تسهل عملية الاصابة واستيطان نسيج المعدة ولانه قابلية الالتصاق تعد الخطوة الاولى من خطوات البكتريا في تكوين المستعمرات على نسيج المعدة واحداث الاصابة [11]

ومن الممكن في دراسات مستقبلية اعتماد اختبار التلازن الدموي في الكشف عن الاختلاف في عوامل الالتصاق (عوامل استيطان الطبقة المخاطية) بين سلالات البكتريا باستخدام انواع مختلفة من كريات الدم الحمراء ليتسنى لنا معرفة ماهية هذه المكونات من اجل فهم سبب الاختلاف في قوة اختبار التلازن الدموي والذي قد يؤشر عاملا جديدا من عوامل ضراوة بكتريا *H. pylori*.

المصادر:

1. Kim , JH . Song, IS . Park , SM . and Min , YI., (1998). *Helicobacter pylori* . Kor. j. Gastroenterol. 31:23-29.
2. Hornemann , F. Nilius , M. Malfertheiner , P. and Bartmann , p., (1997). Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in German infants and children . Helicobacter . 2(4):176-179.
3. Elvira , GG. Guillermo , IPP. Héctor , JMG. and Francisco , JBP., (2014) . A review of *Helicobacter pylori* diagnosis , treatment, and methodsto detect eradication. World J. Gastroenterol. 20(6):1438-1449.
4. Gerald , JC. Barrie , PM. Anderw , GF. and Anthony , S., (1996) . Mackie and McCartney : Practical Medical Microbiology . Churchill Livingstone , USA , 14th ed.
5. Gillespie, SH. and Hawkey, PM., (2006) . Principles and practice of clinical Bacteriology. John Willey and Sons.
6. Bernard , M. Arico , B. Papini , E. and Rizzuto , R., (1997) . *Helicobacter pylori* toxin VacA induces vacuol fomation by acting in the cell cytosol . Mol-Microbiol . 26(4) : 665-674 .
7. Clyne , M. and Drumm , B., (1996) . Cell envelope characteristics of *Helicobacter pylori* : Their role in adherence to mucosal surfaces and virulence . Immunol .Med. Microbiol . 16(2) :141-155.
8. Lee , A. and Megraud , F. , (1996) . *Helicobacter pylori* techniques for clinical diagnosis and basic research . WB SAUNDERS COMPANY LTD, Philadelphia , USA , chap . 16 , pp 213-223 .
9. Tara, CAP. Cynda , C. Iacqueline , MK. Edward , ID. Gabriele , LE. and Paul , I.G., (2012) . Diagnostic performance of the canine Influenza A Virus subtype H3N8 hemagglutination inhibition assay . Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 24(3):499-508.
10. Al-Sultan , ASH . and Al-Jubouri , SHK ., (2002) . Isolating , diagnosis and pathogenicity of *Helicobacter pylori* . Rafi.J. of Sci . 13(2) .
11. Dunn , BE. Cohen , H. and Blaser , MJ., (1997) . *Helicobacter pylori* .

14. Piotrowski , J. Czajkowski , A. Yotsumoto , F. Slomiany , A. and Slomiany , BL. , (1994) . Sulglycotide effect on the proteolyic and lipoltic activities of *Helicobacter pylori* toward gastric mucus . Am.J. Gastroenterol. 89(2) : 232-236 .
15. Cellini , L. Allocati , N. Campli , E. and Dainelli , B., (1994) . *Helicobacter pylori* : fickle germ . Microbiol . Immunol . 38(1):25-30 .
Clin . Microbiol . Rev. 10(4) : 720-741 .
12. Chmiela , M.Czkwianianc , E. Wadstron , T. and Rudnick , W., (1997) . Role of *Helicobacter pylori* surface structures in bacterial interaction with macrophages . Gut. 40:20-24 .
13. Marshall , BJ., (1994) . *Helicobacter pylori* . Am.J. Gastroenterol . 89(8) : 116-128 .

Haemagglutination (HA) test of *Helicobacter pylori*

Saba A.S.H. Al-Sultan *** ***Subhi H.K.Al-Jubouri**

*Section of Medical Biology Anatomy Department ,Ninevah College of Medicine University of Mosul.
**College of Nursing, University of Mosul.

Abstract:

Thirty clinical isolates of *Helicobacter pylori* bacteria obtained from patients attending endoscopy unit of Ibn-Sena teaching hospital in Mosul . These patients were complaining from epigastric pain , dyspepsia , acidity , vomiting , abdominal pain , flatulance , heart burn and melena . The *H. pylori* isolates were used for Haemagglutination assay (HA) , which involves the recognition of various glycoconjugates on the surface of red blood cells . In this study sheep red blood cells has been used in (HA) assay because the sheep erythrocytes surface resemble that of human epithelial cells .

The results proved by (HA) assay, the ability of *H. pylori* to adherence to specific receptors on the surface of Human Epithelial Cell , which is the first step in the pathogenic process .