فلوسیتومتری، روشی سریع و دقیق برای افتراق هلیکوباکترپیلوری زنده از مرده

دکترعبدالفتاح صراف نژاد[۱]، فریبا نورعلی آهاری[۲]، دکترفریده سیاوشی[۳]، فریده خسروی[۴]، دکتر رضا ملک زاده[۵]، دکتر بهروز نیک بین[۶]،

Title: *Flow cytometry: A reliable and rapid method for differentiation of living and dead Helicobacter pylori.*

Authors: *Sarrafnejad A,(PhD); Nooraliahari F,(MSc); Siavoshi F,(PhD); Khosrawi F,(MSc); Malekzadeh R,(MD); Nikbin B,(MD,PhD).*

Abstract: *It is about 20 years that Helicobacter pylori has been discovered as an etiologic factor for peptic ulcer and gastric adenocarcinoma and lymphoma. The bacterium has a spiral form, but under stress conditions can transform to coccoid form. Coccoids are not culturable (by routine methods) therefore it is believed that, they are the morphologic manifestations of cell death. Some investigators successfully showed that coccoids are alive cells. In this research, using flow cytometry, we were able to discriminate between dead and alive cells.*

The results of this study showed that all of the reserved bacteria in water converted to the coccoid form after 24 hours, also after conversion to the coccoid form, the bacteri can live until 11 months under low temperature conditions.

The technique is reliable, fast and convenient to investigate the effect of different environmental factors on H. pylori viability.

Keywords: *Helicobacter Pylori, Peptic ulcer, Coccoid, Flow cytometry.*

۱ – استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲ – کارشناس ارشد باکتریولوژی، بیمارستان شفا یحیاییان
۳ – استادیار گروه میکروبشناسی، دانشکده علوم، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴ – مربی گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۵ – استاد گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۶ – استاد گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

www.SID.ir

چکیده:

هلیکوباکترپیلوری به عنوان عامل ایجاد کننده زخم معده و اثنی عشر و همچنین سرطان معده، شناخته شده است و در شرایط نامناسب محیطی می‌تواند به شکل کوکوئید، تبدیل گردد. به علت اینکه کوکوئیدها در آزمایشگاه براحتی قابل کشت نیستند، تصور می‌شد که باکتری مرده باشد. برخی محققین، با روشهای مختلف توانسته‌اند زنده بودن شکل کوکوئیدی را به اثبات برسانند. در این پژوهش با استفاده از روش فلوسیتومتری، افتراق باکتری زنده از مرده، اجراء واستاندارد شده و با سرعت، دقت و تکرارپذیری خوب، زنده بودن شکل کوکوئیدی باکتری نشان داده شده است.

نتایج مطالعه نشان داد که کلیه باکتریهای نگاهداری شده در آب بعد از ۲٤ ساعت تبدیل به فرم کوکوئید می‌شوند. همچنین باکتری پس از تبدیل به فرم کوکوئید قادر است تا ۱۱ ماه در درجه حرارت پایین زنده بماند.

بدین ترتیب با استفاده ازفلوسیتومتری و باصرف هزینه کمتر، می توان اثر عوامل مختلف رابر روی زندگی باکتری، در کوتاهترین زمان ممکن مطالعه کرد.

گل واژگان: ***هلیکوباکترپیلوری، زخم معده، کوکوئید، فلوسیتومتری.***

.

مقدمه:

کمترازبیست سال است که هلیکوباکترپیلوری به عنوان عامل ایجاد زخم معده واثنی عشر شناسایی شده است(۱و۲). همچنین این باکتری به عنوان عامل سرطان معده(۳و۴)، حساسیت وکهیر(۵و۶) و بیماریهای عروق کرونر(۷و۸) معرفی شده است.

راه انتقال عفونت، احتمالاًازطریق دهان به علت خوردن وآب ومواد غذایی آلوده به مدفوع بیماران می‌باشد(۹).

ازمشکلات مهم بیماران، عودمکرر عفونت، پس از درمان می باشد (۱۰). این امربه خاطر توانایی باکتری برای زنده ماندن در شرایط نامناسب محیطی، چه خارج از بدن و چه داخل معده می باشد(۱۱و۱۲). بدین منظور، باکتری برای مقاومت در برابر شرایط نامساعد و برای زنده ماندن، به شکل گردکوکوئیدی درآمده و به زندگی خود ادامه می‌دهد(۱۳و۱۴).

اگرچه برخی محققین معتقدند که شکل کوکوئیدی باکتری، نوع مردهٔ آن است(۱۵)، ولی اغلب معتقدند که این شکل باکتری زنده است ولی با روشهای معمول آزمایشگاهی قابل کشت نبوده و قادر است در شرایط مساعد، مخصوصاً در بدن، مجدداً فعال شده و ایجاد بیماری نماید(۱۶و۱۷).

جهت شناسایی باکتری زنده از مرده، مطالعات و تلاش های گسترده ای صورت گرفته است(۲۱-۱۸). پژوهش حاضر، روش ساده، سریع و دقیقی را جهت افتراق باکتری زنده از مرده و حتی میزان زنده بودن(فعالیت وتنفس) هلیکوباکترپیلوری معرفی میکند. دراین روش، باکتری درمجاورت رنگ رودامین (مادهٔ فلورسانس) قرار گرفته و در صورت زنده بودن، رنگ راجذب کرده و باکتری خاصیت فلورسانس پیدا می کند. پس از این با استفاده از دستگاه فلوسیتومتر[1] می‌توان باکتری فلورسانس شده‌را شناسایی و شمارش کرد. بدین ترتیب می توان تأثیر محیط و یا عوامل داروئی را بر حیات باکتری براحتی و به سرعت و دقت مورد مطالعه قرار داد.

روش کار:

سوش باکتری:

هلیکوباکترپیلوری ازطریق کشت از بیوپسی معده‌بیماران، معرفی شده از بیمارستان شریعتی تهران جداسازی وموردتأیید و تشخیص بیوشیمیایی قرار گرفت.

سوسپانسیون باکتری و کنترل ها:

باکتری تأیید شده برروی محیط بروسلاآگارحاوی خون گوسفند، کشت داده شد. باکتری با استفاده ازسوآب وPBS (PH= ۷/۲) جمع‌آوری شد و پس از شستشو در همان PBS بصورت معلق (سوسپانسیون) وباشمارش $۱۰^{۷}$ باکتری در میلی لیتر تنظیم گردید. سپس دوگروه لوله (هرگروه پنج عدد) به عنوان کنترل مثبت و منفی، به ترتیب زیر تهیه شد:

1- Flow cytometer

Archive of SID
www.SID.ir

برای تهیه کنترل منفی و کشتن باکتری به لوله های گروه اول به میزان۵ppm پرکلرید(Perchloride)اضافه شد. برای تهیه کنترل مثبت(باکتری زنده) به پنج لولهٔ گروه دوم هیچگونه ماده ای اضافه نشد.

رنگ آمیزی باکتری

به لوله‌های کنترل فوق۲μg/ml رنگ رودامین اضافه می شود. Cat R8004 (Rhodamin 123sigma). همراه رودامین EDTA (pH=۸، ۱mM) نیز به همراه لوله ها اضافه می شود.
لوله ها را بمدت نیم ساعت در حرارت آزمایشگاه نگهداشته و در پایان به نسبت ده درصد فرمالین ۳۷درصد به کلیه لوله ها اضافه کرده تا باکتری ها کاملاً فیکس شوند.

دستگاه فلوسیتومتر:

از دستگاه Coulter مدل Epics Elit که مجهز به Sorter نیز می باشداستفاده شد. نوردستگاه توسط لیزرهلیوم ۴۸۸ نانومتر تأمین شده و برای دیدن باکتری وتحلیل داده‌ها از پارامترهایFS(Forward Scater) که نشان دهندهٔ اندازه باکتری است SS (Side Scater) که نشان دهندهٔ دانستیهٔ باکتری است و PMT3 که نشان دهندهٔ میزان جذب رودامین توسط باکتری است، بهره گرفته شد. سرعت عبور باکتری از مقابل لیزر (سرعت جریان در داخل Flow cell)، معادل ۵۰۰۰ باکتری در هر ثانیه می‌باشد.
براساس عبور باکتری از دستگاه فلوسیتومتر و براساس FS و SS، جمعیت باکتری را انتخاب کرده و با رسم gate بر روی جمعیت باکتری، آنها رابرای هرگونه مطالعه وتجزیه وتحلیل آماری، توسط کامپیوتردستگاه فلوسیتومتری، آماده نمودیم(شکل۱).

شکل ۱- تصویر باکتریها در فلوسیتومتر و رسم gate **(شکل مربع) جهت انتخاب آنها** (محور عمودی (FS) نشان دهندهٔ اندازه باکتری است و محور افقی(PMTI یا SS) نشان دهنده لگاریتم دانستیهٔ باکتری است. نقطه ها هر کدام نمایندهٔ یک باکتری است و شکل مربع در واقع gate رسم شده است که کامپیوتر دستگاه جمعیت داخل آنرا برای محاسبات و تجزیه و تحلیل داده ها مورد مطالعه قرار می دهد).

مطالعه اثر آب بر حیات باکتری:

برای مطالعه اینکه آیا باکتری می تواند در آب زنده بماند و تا چه مدتی به ترتیب زیر عمل شد:
سه گروه فلاسک نگهداری آب انتخاب کرده، در گروه اول آب رودخانه، گروه دوم آب مقطر وگروه‌سوم آب لوله کشی شهری قرار داده شد. هرگروه از ۹ فلاسک تشکیل شده و کلیه آبهای ذکر شده قبلاً استریل و فیلتر شدند. هر گروه از فلاسکها به سه دسته سه تایی تقسیم شده و هردسته دریک درجه حرارت(۴و ۲۲، ۳۷) نگهداری‌شدند. درکلیه فلاسکها هلیکوباکترپیلوری به‌غلظت نهایی $۱۰^{۷}$ باکتری در میلی لیتر قرار داده شد.
رنگ آمیزی کلیهٔ باکتری ها با رودامین و مطابق روش فوق انجام شده و برای مطالعه فلوسیتومتری آماده شدند.

بررسی میکروسکوپی:

از کلیه نمونه های باکتری قبل از رنگ آمیزی با رودامین یک نمونه میکروسکوپی تهیه کرده تا شکل ظاهری باکتری (اسپریل یا کوکوئیدی) مطالعه و ثبت گردد.

یافته ها:

خوانش لوله‌های کنترل منفی (باکتری کشته شده توسط پرکلرید) نشان دادکه کلیهٔ باکتری ها، کشته شده(شکل۲) و ولتاژ PMT3 دستگاه را طوری تنظیم کردیم که در منطقهٔ مثبت فقط دو درصد باکتری رنگ شده دیده شود.

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۲- باکتریهای کشته شده توسط پرکلرید و عدم رنگ پذیری آنها (کنترل منفی) (جمعت مرده باکتری از مبدأ صفر، توسط A نشان داده شده است. این جمعیت معادل ۹۸درصد می باشد.. سمت راست، جمعیت زنده باکتری توسط بردار B نمایش داده شده است که معادل ۲ درصد می باشد).

خوانش لوله‌های کنترل مثبت نشان داد که باکتری آنها زنده است و ۹۴درصد این باکتری‌ها رنگ رودامین را به خود جذب کرده و در منطقه مثبت PMT3 قرار گرفتند(شکل ۳).

فلاسک های حاوی باکتری تا ۱۱ ماه نگهداری شدند و در زمانهای مختلف از آنها برای تعیین درصد باکتری‌های زنده، نمونه برداری شد که نتیجه آن در جدول ۱ منعکس شده است.

جدول ۱- درصد باکتری های زنده پس از ۱۱ ماه نگهداری در محیط های آبی، با استفاده از فلوسیتومتری (هر کدام از فلاسکها حاوی 10^7 باکتری در میلی لیتر بوده، و اعداد داخل جدول نمایشگر درصد باکتریهای زنده هر فلاسک می باشد).

محیط آبی / درجه حرارت	آب شهری	آب مقطر	آب رودخانه
۳۷ C	٪۴۴/۳	٪۲۸/۴	٪۲۹/۳
۲۲ C	٪۷۰/۶	٪۶۳/۶	٪۷۲/۳
۴ C	٪۹۵/۶	٪۹۶/۵	٪۹۵/۲

مطالعه میکروسکوپی نشان دادکه کلیه باکتری های نگهداری شده در آب بعد از ۲۴ ساعت به شکل کوکوئید تبدیل می شوند.

شکل ۳- باکتریهای زنده که رنگ رودامین را به خوبی جذب کرده اند (کنترل مثبت) (جمعت مرده باکتری از مبدأ صفر، توسط A نشان داده شده است. این جمعیت معادل ۶درصد می باشد.. سمت راست، جمعیت زنده باکتری توسط بردار B نمایش داده شده است که معادل ۹۴درصد می باشد).

بحث:

عفونت هلیکوباکترپیلوری که منجر به زخم معده، اثنی عشر، سرطان معده و عوارض دیگر می گردد، انتشار وسیعی در جهان دارد(۲۵-۲۲). راه انتقال آلودگی عمدتاً از طریق مدفوع افراد آلوده می باشد که پس از آلودگی آب و مواد غذایی به افراد سالم و اعضاء خانواده مخصوصاً کودکان منتقل می شود (۲۲و۲۹-۲۶). علت این امر مقاومت زیاد باکتری در برابر شرایط نامناسب محیطی می باشد، که ازطریق تبدیل باکتری به شکل کوکوئیدی (مقاوم) می باشد(۳۰). آزمون میکروسکوپی نشان داد که در کلیهٔ مواردی که باکتری درآب نگهداری شده بود، پس از ۲۴ ساعت به شکل کوکوئید تبدیل گردید.

محققین زیادی تلاش کرده اندکه زنده بودن شکل کوکوئیدی باکتری را به اثبات رسانند، ولی چون این شکل باکتری با روشهای معمول آزمایشگاهی قابل کشت نیست، اثبات این مدعابا مشکلات فراوان و گاهی غیرممکنه مواجه بوده است(۱۴و۱۵و۱۹و۳۱).

دراین مطالعه با استفاده از روش فلوسیتومتری، توانستیم باکتری‌های زنده را با رودامین رنگ‌آمیزی نموده و تفاوت‌مشخصی را در میزان جذب رنگ توسط باکتری زنده و مرده پیدا کنیم. برای این منظور، ابتدا دو نمونه کنترل مثبت (باکتری زنده) و کنترل منفی(باکتری مرده) تهیه نمودیم و دستگاه فلوسیتومتر را با آنها تنظیم نموده و پروتکل اختصاصی مربوطه را کامپیوتر دستگاه منتقل کردیم.

نگهداری باکتری درآب (مقطر، رودخانه ولوله کشی) نشان داد که باکتری پس از تبدیل به فرم کوکوئیدی قادر است تا ۱۱ ماه مخصوصاً در درجه حرارت پایین، زنده بماند(جدول ۱) که پیش از این توسط نویسندگان گزارش شده بود(۳۲).

بنابراین علت عودمکرربیماری ودشواری ریشه کنی آن، می تواند به دلیل مقاومت باکتری و تبدیل شدن آن به شکل کوکوئیدی باشد. عدم موفقیت مراجع مختلف در جدا کردن باکتری از آب و یا مواد غذایی، به خاطر غیرقابل کشت بودن باکتری درشرایط عادی می باشد، ولی متأسفانه باکتری پس ازرسیدن به معده انسان، فضا

Archive of SID

www.SID.ir

و شرایط مناسب برای رشد مجدد را پیدا کرده و آلودگی جدیدی را آغاز می کند(۱۸و۳۳).

اگرچه روش فلوسیتومتری به عنوان روش سریعو دقیقی برای شناسایی باکتری زنده آئروموناس سالمونیسیدا بکاررفته است(۲۴)، ولی گزارش حاضر، برای اولین بار است که در مورد هلیکوباکترپیلوری اجراءوارائه میگردد. بدیهی است با توجه به امکانات فلوسیتومتری موجود در سطح کشور و با استفاده از این روش می توان تحقیقات مختلف و متعددی را جهت مطالعه مقاومت باکتری در برابر عوامل مختلف(حرارت- آب- فاضلاب- دارو و ...) انجام داد و گام بلندی را در جهت بهداشت، کنترل بیماری و انتخاب داروی مناسب برای درمان برداشت.

نتیجه گیری:

روش فلوسیتومتری بسیارحساس، دقیق وسریع است ودر مدت کوتاهی می تواند تعداد زیادی باکتری را مورد مطالعه و تجزیه و تحلیل قرار دهد. بدین ترتیب با توجه به توانائی این روش جدید برای تمایز بین هلیکوباکترپیلوری زنده و مرده، می توان این روش را باسرعت زیاد و در زمان کوتاه برای ارزیابی تأثیرعوامل مختلف برروی هلیکوباکترپیلوری، مورد مطالعه قرار داد. بنابر این محققین مختلف وتولیدکنندگان مواد داروئی می توانندرزمان کوتاهی تأثیر فرآورده های داروئی خود را (داروهای سنتی، جدید و ...) بر روی هلیکوباکترپیلوری مورد مطالعه قرار دهند.

References:

1- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet. 1984; 1311-5.

2- Marshall BJ. Prospective double trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *campylobacter pylori*. Lancet 1988; 1437-42.

3- Correa P, Miller M. *Helicobacter pylori* and gastric atrophy cancer paradoxes. J Natl Cancer Inst 1995; **87**: 1731-2.

4- Eurogast Study Group. An international association between *Helicobacter pylori* and gastric cancers. Lancet 1993; **34**: 1359-62.

5- Farhoudi M. Is peptic ulcer Helicobacter pylori infection the cause of chronic urticaria? Iranian J Allergy, Asthma Immunol 2000; **1**(1): 17-19.

6- Valsecchi R, Pigatto P. Chronic urticaria and *Helicobacter pylori.* Acta Derm Venerol(stockh). 1998; **78**: 440-2.

7- Ellis RW. Infection and coronary heart disease. J Med Microbiology 1997; **46**(7): 535-9.

8- Kusters JG, Kaipers EJ. Helicobacter and atherosis. Am Heart J 1999; **138**: 5523-41.

9- Feldman RA. Epidemiology of *Helicobacter pylori* acquisition. transmission, population prevalence and disease to infection ratio. Br Med Bull 1998; **54**(1): 39-53.

10-Xia HX. Recurrence of *Helicobacter pylori* infection after successful eradication. Dig Dis Sci 1997: 42(9): 1821-34.

11-West AP, Millar MR, Tompkins DS. Survival of Helicobacter pylori in water and saline J Clin Pathol 1990; **43**: 609.

12-Shahamat M. Survival of *Helicobacter pylori* In environment, [Abst]. I-101, P215. Abstract of the 10th Annual Meeting of Americcan Society for Microbiology. American Society for Microbiolosy, Washington, D.C. 1990.

13-Catrenich CE, Makin KM. Characterization of Morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid forms. Scand J Gastroenterol 1991; **26**(suppl. 181): 58-64.

14-Bode G, Mauch F, Malfer theiner P. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. Epidemiol Infect 1993; **111**: 483-490.

15-Kusters JG. Coccoid forms of *Helocobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death . Infec Immun 1997; **65**(9): 3672-9.

16-Anderssen A. Growth and Morphological transformation of *Helicobacter pylori* in Broth Media. J Clin Microbiol 1997; **35**(11) : 2918-22.

17-Telford JL, Covacci A, Rappuoli R, et al. Immunobiology of *Helicobacter pylori* infection. Curr opin Immunol 1997; **9**: 498-503.

18- Luigina C. *Helicobacter pylori*: A ficke germ. Microbiol Immunol 1994; **38**(1): 25-30.

19- Benaissa M. Changes in *Helicobacter pylori* ultra structure and antigens. During conversion from the bacillary to coccoid from. Infect Immun 1996; **64**(6): 2331-5.

20- Willen R, Carlen B, Wang X, et al. Morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from spiral to cocccoid form. Scanning (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) suggest viability. Ups J Med Sci 2000; **105**(1): 31-40.

21- Nilius M. Coccoid like forms (CLF) of *Helicobacter pylori*. Enzyme activity and antigenicity. Zentralbl Bakteriol 1993; **280**: 259-72.

22- Marshall BJ. *Helicobacter pylori*. Am J Gastroentrol 1994; **89**(8): S116-S28.

23- Moss SF. *Helicobacter pylori*-more light, less heat. Am J Gastroenterol 1998; **93**(3): 306-10.

24- Farthing MJ. *Helicobater pylori* infection: An overview. Br Med Bull 1998: **54**(1): 1-6.

25- Mecoll KEL. *Helicobacter pylori*: Clinical aspects. J Infection 1997: **34**: 7-13.

26- Moss S, Calam J. *Helicobacter pylori* and peptic ulcers: The present position. Gut 1992; **33**: 289-292.

27- Velazquez M, Feirtag JM. *Helicobacter pylori*: Characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water. Int J Food Microbiol 1999; **53**(2-3): 95-104.

Archive of SID

www.SID.ir

28- Drumm. Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med 1990; **322**(6): 359-63.
29- Dowsetl SA. *Helicobacter pylori* infection in indigenous families of central America: serostatus and oral and fingernail carriage J Clin Microbiol 1999; **37**(8): 2456-60.
30- Lai-King NG, Sherburne R, Taylor DE, et al. Morphological forms and viability of campylobacter species studied by electron microscopy. J Bacteriol 1985; **164**: 338-43.
31- Brenciaglia MI, Fornara AM, Scaltrito MM, et al. *Helicobacter pylori*: Cultivability and antibiotic susceptibility of coccoid forms. Int J Antimicrobial agents 2000: **13**: 237-41.
32- Nourali-Ahari F, Siavoshi F, Sarrafnejad A, et al. The viability of *H. pylori* in the water environments over one year. Gastroenterology 1996; **110**(4): 17.
33- Wang X, Stutegard E, Rupar R, et al. Infection of BALB/C A mice by spiral and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol 1997; **46**: 657-63.
34- Morgan JAW, Rhodes G, Pickup W. Survival of nonculturable *Aermonoas salmonicida* in lake water. APPL Enriron Microbiol 1993; **59**(3): 874-80.

Archive of SID

www.SID.ir