JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره هشتم، شماره دوم، ۱۳۹۱، پیاپی ۲۵: ۹۰-۷۵

معرفی روشی مناسب جهت جداسازی اووسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* فاقد باکتری از مدفوع حیوانات آلوده

پرویز شایان[1]*، زینب اصغری[1]، الهه ابراهیم زاده[1]، زهرا امیدیان[1]، فیصل ضرغامی[1]

۱- گروه انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۶ دی ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: ۲۱ بهمن ۱۳۹۱

چکیده

کریپتوسپوریدیوم پاروووم تک یاخته‌ای مشترک بین انسان و حیوان می‌باشد، که در افراد دچار نقص ایمنی و نوزاد حیوانات بخصوص گوساله‌ها بیماریزا می‌باشد. اووسیست‌های دفع شده از دام‌های آلوده باعث آلودگی محیط بخصوص منابع آب‌های سطحی می‌شوند. با توجه به این که حتی تعداد کم اووسیست می‌تواند آغازگر بیماری باشد و از طرف دیگر اووسیست‌ها به ضدعفونی کننده‌های متداول مقاومند، این تک یاخته مورد توجه محققین قرار گرفته و همواره تلاش شده است روش‌های جداسازی و تخلیص اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم حتی در نمونه‌های محیطی دارای تعداد کم اووسیست بهینه شود و اووسیست‌هایی کاملا خالص و عاری از آلودگی‌های باکتریایی و سایر ناخالصی‌ها به منظور مطالعات ایمنولوژیکی و مولکولی فراهم گردد. روش‌های مختلفی که تا کنون استفاده شده‌اند تا حدودی موفقیت آمیز بوده‌اند ولی هیچیک نتوانسته‌اند به اووسیست عاری از باکتری دست پیدا کنند. هدف از این تحقیق دست یابی به اووسیست عاری از باکتری می‌باشد. در این تحقیق به منظور جداسازی اولیه اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم، ابتدا چهار روش شناورسازی شامل استفاده از محلول نمک طعام، محلول ساکارز، شیب غلظتی پلکانی فایکول و محلول ساکارز ۵۵ درصد استفاده گردید. محلول ساکارز ۵۵ درصد بهترین روش برای جداسازی اولیه اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم ارزیابی گردید. جهت حذف باکتری و سایر ناخالصی‌های همراه از فیلتر نیتروسلولز (با منافذ ۳ میکرون) استفاده گردید. آنالیز اووسیست‌های استخراج شده نشان داد که اووسیست‌های حاصل از فیلتراسیون عاری از هرگونه باکتری بود و درصد آن‌ها ۳۰ ارزیابی گردید. اگر چه تعداد زیادی از اووسیست‌ها در حین تخلیص از دست رفتند، اما اووسیست‌های تخلیص شده برای آزمایشات پروتئومیکس بسیار مناسب می‌باشند.

کلمات کلیدی: *کریپتوسپوریدیوم پاروم، اووسیست، شناورسازی، فیلتراسیون*

* *نویسنده مسئول: پرویز شایان*

آدرس: گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران. تلفن: ۶۱۱۱۷۰۹۴-۰۲۱

پست الکترونیک: pshayan@ut.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

کریپتوسپوریدیوم تک‌یاخته‌ای از شاخه اپی کمپلکسا است که لایه مسواکی سلول‌های روده‌ای اکثر مهره داران را مورد تهاجم قرار می‌دهد. تا چندی پیش به عنوان یک انگل فرصت طلب غیرمتداول مطرح بود ولی اکنون به عنوان یک عامل بیماریزای روده‌ای در بیماری‌های مشترک انسان و دام بویژه در مبتلایان به نقص ایمنی مورد توجه قرار گرفته است (۱و۲). اووسیست‌های دفع شده توسط دام‌های آلوده از جمله گوساله می‌تواند موجب آلوده شدن محیط مانند منابع سطحی آب شود. گزارش شده است که تعداد کم اووسیست *کریپتوسپوریدیوم پاروم* می‌تواند آغازگر آلودگی باشد. با توجه به مقاومت اووسیست‌ها به ضدعفونی کننده‌های متداول و عدم وجود درمان قطعی علیه *کریپتوسپوریدیوم*، لزوم تشخیص اووسیست *کریپتوسپوریدیوم پاروم* حتی در نمونه‌هایی با تعداد کم وجود دارد. انجام تحقیقات مولکولی و پروتئومیکس بر روی *کریپتوسپوریدیوم پاروم* به تعداد زیاد و خالص اووسیست نیاز دارد (۱۶). تاکنون روش‌های مختلفی مانند استفاده از محلول ساکارز (۲)، محلول نمک طعام (۵ و۹)، محلول ساکارز ۵۵٪ (۲۳)، شیب غلظتی غیرمنقطع ساکارز همراه با شیب غلظتی پرکل (۴و۱۶) به منظور تخلیص اووسیست‌های تک‌یاخته مذکور استفاده شده است. روش‌های مبتنی بر تخلیص از طریق ایمنومگنتیک جهت جداسازی اووسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم پاروم* نیز گزارش شده است (۸). اگر چه در روش ایمونومگنتیک اووسیست‌های خالص قابل جداسازی می‌باشند، اما این روش به علت گرانی تهیه مواد مورد نیاز همیشه امکان‌پذیر نمی‌باشد. لذا روشی که بتواند اووسیست‌ها را ارزان از هرگونه ناخالصی جداسازی کند، نقش مهمی را در تحقیقات پروتئومیکسی مربوط به این تک یاخته ایفا خواهد نمود.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه و جداسازی اولیه اووسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم پاروم*

از گوساله‌های اسهالی مشکوک به کریپتوسپوریدیوز موسسه تحقیقاتی امین آباد دانشگاه تهران، با آزمایش رکتال نمونه مدفوع جمع‌آوری شد و هم حجم آن بی‌کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد اضافه و به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی منتقل گردید. نمونه‌ها تا زمان آزمایش در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در آزمایشگاه از نمونه‌های مدفوع گسترش تهیه و با روش ذیل نلسون اصلاح شده رنگ‌آمیزی گردید. گسترش‌ها پس از رنگ آمیزی با درشت نمایی ۴۰ برابر میکروسکوپ نوری مشاهده و در صورت وجود آلودگی بیش از ۲۰ اووسیست *کریپتوسپوریدیوم پاروم* در هر میدان دید میکروسکپ اقدام به تخلیص اووسیست‌ها از مدفوع با استفاده از محلول ساکارز اشباع گردید.

استخراج DNA از اووسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم* و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR)

به منظور تایید مولکولی این که اووسیست‌های مورد شناسایی در رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده *کریپتوسپوریدیوم پاروم* می‌باشند، استخراج DNA از اووسیست‌های مذکور با استفاده از کیت (DNA extraction kit, MBST, Iran) بر اساس دستورالعمل سازنده انجام پذیرفت. پس از آن برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از پرایمرهای اختصاصی F1=(5`aagctcgtagttggatttctg 3`) و R1=(5` taaggaacaacctccaatctc 3`) منشعب

Archive of SID

www.SID.ir

از ژن 18S ribosomal RNA جنس *کریپتوسپوریدیوم* استفاده گردید. به این منظور یک میکرولیتر از DNA استخراج شده جهت تکثیر استفاده شد. میزان ۱۰ میکرولیتر PCR buffer 10x، ۲ میکرولیتر dNTP (10 mM)، ۳ میکرولیتر $MgCl_2$ (50 mM)، ۲ میکرولیتراز هر پرایمر Forward (20 µM) و Reverse (20 µM)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز (5U/µl) و آب دوبار تقطیرشده استریل به اندازه‌ای که حجم نهایی واکنش ۱۰۰ میکرولیتر باشد، اضافه شده و در دستگاه ترموسیکلر (MWG Germany) با برنامه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه به منظور واسرشت اولیه دو رشته DNA، ۳۵ چرخه با برنامه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، و جهت تکمیل نهایی ساخت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه تکثیر مکرر DNA انجام پذیرفت. جهت تعیین و تشخیص گونه *پاروم* ابتدا محصول PCR از ژل آگارز پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید تحت اشعه UV استخراج و تخلیص گردید. در ادامه محصول PCR تخلیص شده با استفاده از پرایمر اختصاصی گونه *پاروم* (F2=5`catattactatttttttttttag 3`) که از ترادفی محصور شده از دو پرایمر قبلی تشکیل شده است، مورد ارزیابی قرار گرفت. ترادف نوکلئوتیدی این پرایمر فقط در گونه *پاروم* موجود بوده و در گونه‌های دیگر این قسمت از ژن از ترادف نوکلئوتیدی دیگری تشکیل شده است. تکثیر مکرر DNA تحت شرایط ذکر شده (دمای اتصال آغازگرها به ۵۰ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت) با پرایمرهای F2 و R1 انجام گرفت. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شده پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید تحت اشعه UV مورد ارزیابی قرار گرفت.

آلوده‌سازی تجربی گوساله به *کریپتوسپوریدیوم پاروم*

پس از تشخیص و تایید مولکولی *کریپتوسپوریدیوم پاروم*، به منظور دستیابی به تعداد زیاد اووسیست از یک منبع واحد، یک راس گوساله هولشتاین تازه متولد شده از مادر فاقد پادتن ضدکریپتوسپوریدیوم از موسسه تحقیقاتی امین آباد انتخاب شد. از مدفوع گاو مادر و مدفوع گوساله قبل از آلوده سازی گسترش تهیه گردید و به روش ذیل نلسن اصلاح شده رنگ آمیزی و مورد ارزیابی قرار گرفت. گوساله‌ای که خود (همانطور که انتظار می‌رفت) و مادرش از لحاظ وجود اووسیست در مدفوع منفی بود، برای آلودگی تجربی به محیطی عاری از اووسیست انتقال داده شد. گوساله مورد نظر از آغوز محروم و ۲۴ ساعت پس از تولد جهت تضعیف سیستم ایمنی ۱۰mg/kg دگزامتازون به آن تزریق گردید. چهل و هشت ساعت پس از تولد به گوساله ۱۰×۱۰^{۶} اووسیست *کریپتوسپوریدیوم پاروم* خورانیده شد و مجددا ۶۰ ساعت پس از تولد نیز به همان میزان دگزامتازون تزریق گردید. جهت پیشگیری از آلودگی‌های باکتریایی ۴۸ ساعت پس از تولد به گوساله میزان ۱۰ mg/Kg انروفلوکساسین تزریق گردید. پنج روز بعد با بروز اولین علائم اسهال، مدفوع جمع‌آوری و در مجاورت بیکرومات پتاسیم ۲/۵ درصد به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از تهیه گسترش و رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده و روش‌های ذکر شده مولکولی در بالا حضور اووسیست *کریپتوسپوریدیوم پاروم* در مدفوع تایید شد. از روز پنجم تا ۱۱ روز پس از آلودگی اقدام به جمع‌آوری مدفوع گردید و در مجاورت بیکرومات ۲/۵ درصد در دمای ۴°C نگهداری شد. اووسیست‌ها با استفاده از

Archive of SID

www.SID.ir

روش‌های مختلف از مدفوع استخراج و تخلیص گردید. در مواردی که چربی مدفوع بالا بود، مدفوع جمع‌آوری شده در مجاورت بیکرومات پتاسیم ۲/۵ درصد و اتر قرار داده شدند.

روش‌های مختلف خالص سازی اووسیست *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* از مدفوع

نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از گوساله‌ای که به روش تجربی به کریپتوسپوریدیوز آلوده شد با ۳ برابر حجم آب مخلوط و به ترتیب از الک‌های شماره ۴۵، ۱۰۰، ۱۵۰ عبور داده شد. محلول حاصل از الک آخر با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. قبل از تخلیص کشت باکتریایی از نمونه در محیط LB انجام پذیرفت و کلونی‌های حاصل شمارش گردید. در نهایت به منظور استخراج اووسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* روش‌های زیر مورد استفاده قرار گرفت:

۱- خالص سازی اووسیست *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* با استفاده از آب نمک اشباع:

مطابق روش لیو و همکاران (۲۰۰۱)، یک حجم از نمونه مدفوع حاوی اووسیست با ۱۰ حجم محلول اشباع کلرید سدیم (نمک طعام) مخلوط و یک حجم آب به آرامی روی آن قرار داده شد. به مدت ۱۰ دقیقه و ۱۹۰۰×g سانتریفوژ گردید. قسمت میانی (لایه زیر آب مقطر و بالای محلول آب نمک اشباع) حاوی اووسیست‌های جدا شده بود که با PBS با pH= ۷/۲ و تحت ۱۹۰۰×g به مدت ده دقیقه سانتریفوژ گردید (۲۲). تعداد اووسیست‌ها بر روی لام مدرج هموسیتومتر با درشتنمایی ۴۰ برابر میکروسکوپ نوری شمارش و طبق فرمول (میزان اووسیست‌های شمارش شده × حجم نمونه مورد نظر × ده هزار) محاسبه گردید. در نهایت از اووسیست‌های جدا شده گسترش تهیه و به روش ذیل نلسون اصلاح شده و گرم رنگ آمیزی گردید. پس از تخلیص، کشت باکتریایی نمونه در محیط LB انجام پذیرفت و کلونی‌های حاصل شمارش گردید.

۲- خالص سازی اووسیست *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* با استفاده از ساکارز اشباع:

مطابق روش کرنت و همکاران (۱۹۹۰)، ۵ میلی لیتر از رسوب حاوی اووسیست با ۳۰ میلی لیتر محلول ساکارز اشباع به خوبی مخلوط و تحت ۱۵۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. این عمل چهار بار تکرار گردید و هر بار یک میلی لیتر آب مقطر را روی محلول ساکارز ریخته و اووسیست‌ها از سطح محلول با پیپت پاستور جمع‌آوری، درون PBS (pH=7.2) ریخته شد و به مدت پانزده دقیقه و تحت ۲۰۰۰×g سانتریفوژ گردید (۲). در نهایت مانند آنچه در روش آب نمک اشباع بیان شد، اووسیست‌ها شمارش گردید. از اووسیست‌های جدا شده گسترش تهیه و به روش ذیل نلسون اصلاح شده و گرم رنگ آمیزی گردید. پس از تخلیص، کشت باکتریایی نمونه در محیط LB انجام پذیرفت و کلونی‌های حاصل شمارش گردید.

۳- خالص سازی اووسیست *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* با استفاده از شیب غلظتی پلکانی فایکل:

مطابق روش لامب و همکاران(۱۹۸۸)، حجم‌های برابر از فایکول ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۶ درصد، به ترتیب از غلظت ۰/۵ درصد تا ۶ درصد روی یک حجم مایع حاوی اووسیست به آرامی قرار داده شد و بدین ترتیب یک ستون با شیب غلظتی پلکانی ایجاد گردید. سپس تحت ۹۰۰×g به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ گردید. اووسیست‌ها در لایه فایکول ۰/۵ درصد باند تشکیل دادند که به طور جداگانه لایه‌ها جمع‌آوری و

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی گردید. و هر لایه جداگانه با PBS استریل دارای pH= ۷/۲ تحت ۱۰۰۰×g سانتریفوژ و سه بار شستشو داده شد (۱۰). در نهایت مانند آنچه در روش آب نمک اشباع بیان شد اووسیست‌ها شمارش گردید. از اووسیست‌های جدا شده گسترش تهیه و به روش ذیل نلسون اصلاح شده و گرم رنگ آمیزی گردید. پس از تخلیص، کشت باکتریایی نمونه در محیط LB انجام پذیرفت و کلونی‌های حاصل شمارش گردید.

۴- خالص سازی اووسیست *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* با استفاده از محلول ساکارز ۵۵ درصد اصلاح شده:

برای این منظور از روش وینتر و همکاران (۲۰۰۰) با کمی تغییرات استفاده شد. نمونه مدفوع دو تا سه بار با PBS (pH=7.2) تحت ۳۰۰۰×g به مدت ده دقیقه سانتریفوژ شد. سپس برای زدودن چربی، در فالکون ۵۰ میلی لیتری، ۱۰میلی لیتر از نمونه با یک حجم اتر بعلاوه سه حجم بی کربنات سدیم ۱ درصد خوب مخلوط شد. به مدت ۱۰ دقیقه تحت ۳۰۰۰×g سانتریفوژ گردید. لایه چربی موجود در قسمت بالای ظرف دور ریخته شد و لایه رسوب نگه داشته شد. در صورت چرب بودن مدفوع این مرحله دوباره تکرار می‌شد. برای زدودن اتر و زدودن چربی باقی مانده از بافر Tris-EDTA جهت شستشو استفاده و تحت ۳۰۰۰×g به مدت ده دقیقه سانتریفوژ و دوباره همین مرحله تکرار شد (۱۹).

۵ میلی لیتر از مایع حاوی اووسیست حاصله با ۴۰ میلی لیتر ساکارز ۵۵ درصد خنک، خوب مخلوط گردید و ۱۰ میلی لیتر آب مقطر بسیار خنک به آرامی روی آن ریخته شد و دو قسمت جدا تشکیل شد. ظرف به آرامی در سانتریفوژ تحت ۳۰۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. سه قسمت کاملا جدا شامل لایه آب مقطر در قسمت بالا، لایه میانی شامل اووسیست‌های شناور شده و لایه رسوب در ته لوله تشکیل شد. هر کدام از قسمت‌ها به طور جداگانه با PBS (pH=7.2) تحت ۳۰۰۰×g به مدت ده دقیقه سانتریفوژ شد (۲۳). اووسیست‌های هر قسمت به صورت جداگانه جمع‌آوری و در نهایت مانند آنچه در روش آب نمک اشباع بیان شد، اووسیست‌ها شمارش گردیدند. از اووسیست‌های جدا شده گسترش تهیه و به روش ذیل نلسون اصلاح شده و گرم رنگ آمیزی گردید. پس از تخلیص، کشت باکتریایی نمونه در محیط LB انجام پذیرفت و کلونی‌های حاصل شمارش گردید.

۵- استفاده از روش‌های تکمیلی جهت کاهش باکتری‌های همراه با اووسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم پاروووم*:

به منظورکاهش باکتری‌های همراه با اووسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* از سه روش استفاده از بافر لیزکننده باکتری، استفاده از آنتی‌بیوتیک موثر و فیلتراسیون استفاده شد. در روش استفاده از بافر لیزکننده قبل از شناورسازی رسوب حاوی اووسیست *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* با هیپوکلریت سدیم رقیق شده به نسبت ۱ به ۱۰ مجاور و بعد از ۱۰ دقیقه سه بار شستشو انجام گردید. سپس مخلوط همگن رسوب با ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده باکتری ساخت شرکت MBST و ۲۵ میکرولیتر TritonX و ۲۰ میکرولیتر لیزوزوم (10mg/ml) به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه ۴ میلی لیتر فایکول به آرامی روی ۲ میلی لیتر از مخلوط همگن قرار داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه تحت ۱۶۰۰×g سانتریفوژ گردید. محلول حاصل شامل سه لایه بود. هر کدام از لایه‌ها به طور جداگانه با PBS (pH=7.2) شستشو داده شد. اووسیست‌های جمع‌آوری شده بر روی لام مدرج هموسیتومتر شمارش و محاسبه گردید. از این اووسیست‌ها دوگسترش یکی جهت رنگ آمیزی

Archive of SID

www.SID.ir

ذیل نلسون اصلاح شده و دیگری رنگ آمیزی گرم تهیه گردید. روش دیگر استفاده از آنتی بیوتیک بود. به این منظور از محلول حاوی اووسیست کشت و آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفوژن (Disk diffusion) توسط آزمایشگاه میکروب شناسی انجام گرفت. آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده شامل سفتریاکسون (Ceftriaxone)، سیپروفلوکساسین (Ciprofloxacin) و سفتازیدیم (Ceftazidime) بود. سفتریاکسون به عنوان آنتی بیوتیک حساس انتخاب شد. ۹ میلی لیتر آب مقطر استریل را با ویال یک گرمی پودر آنتی‌بیوتیک سفتراکس ساخت شرکت داروسازی جابربن حیان مخلوط و حدود ۲۵۰ میکرولیتر از محلول حاوی اووسیست به آن اضافه کرده و روی صفحه متحرک به مدت یک شب در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس شستشو انجام شد و قبل و بعد از این مرحله از محلول حاوی اووسیست گسترش تهیه و رنگ آمیزی گرم و کشت باکتریایی صورت گرفت. روش سوم جهت زدودن باکتری از نمونه استفاده از فیلتراسیون بود. پس از خالص سازی اولیه با استفاده از روش وینتر و همکاران (۲۰۰۰) از فیلتر نیتروسلولز استفاده شد. اووسیست‌ها در ۱۰ میلی لیتر PBS (pH=7.2) رقیق گردیده و از فیلتر که در نگهدارنده آن فیکس شده بود، عبور داده شد. ۵۰ میلی لیتر PBS (pH=7.2) از فیلتر عبور داده شد، اووسیست‌ها به واسطه اندازه شان روی فیلتر ماندند و باکتری‌ها عبور کردند. اووسیست‌های روی فیلتر به کمک PBS (pH=7.2) و سمپلر به آرامی و با دقت جمع‌آوری شد. مایع عبور کرده از فیلتر نیز جمع‌آوری گردید. فیلتر هم با ۱۰ میلی لیتر PBS (pH=7.2) در یک ظرف استریل روی صفحه لرزان قرار داده شد تا باقی مانده اووسیست‌ها از فیلتر جدا شوند. سپس برای اطمینان از اینکه اووسیست‌ها در منفذهای فیلتر باقی نمانند فیلتر را برعکس حالت قبل در نگهدارنده قرار داده و با PBS (pH=7.2) شستشوی معکوس انجام گردید. تعداد اووسیست‌های جمع‌آوری شده از هر مرحله بر روی لام مدرج هموسیتومتر شمارش و محاسبه گردید. از این اووسیست‌ها دوگسترش یکی جهت رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده و دیگری رنگ آمیزی گرم تهیه گردید.

نتایج

از نمونه‌های مدفوع گوساله‌های اسهالی مشکوک به کریپتوسپوریدیوز درآزمایشگاه انگل شناسی گسترش تهیه و به روش ذیل نلسون اصلاح شده رنگ آمیزی گردید. اووسیست‌ها به صورت اجسام کروی به ابعاد ۴ تا ۶ میکرون به رنگ قرمز در زمینه سبز مشاهده گردید (تصویر شماره ۱). استخراج اووسیست‌ها از نمونه‌های مثبتی که در هر میدان دید میکروسکوپ با بزرگ نمایی صد برابر، دارای ۵-۴ عدد اووسیست بودند، انجام گردید. در واکنش زنجیره‌ای DNA با دو پرایمر F1 و R1 که از ژن 18S rRNA طراحی شده بودند محصولی به اندازه ۴۱۲ جفت باز به دست آمد که از لحاظ اندازه با تعداد نوکلئوتیدهای متشکله از توالی پرایمرها و قطعه بین آنها برابری داشت. برای تعیین گونه *کریپتوسپوریدیوم* از روش تکثیر مکرر DNA با دو پرایمر F2 و R1 استفاده گردید که نتیجه این واکنش، محصولی به اندازه ۳۵۴ جفت باز بود (تصویر شماره ۲).

به این طریق اووسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* جدایه ایران با انجام آزمایشات مذکور تشخیص داده شد. گوساله آلوده شده به روش تجربی از روز پنجم پس از آلوده سازی شروع به دفع اووسیست

Archive of SID

www.SID.ir

کریپتوسپوریدیوم پاروووم نمود و در طول هفت روز متوالی حدود ۸۰۰ میلیون اووسیست از مدفوع گوساله جمع‌آوری گردید. اووسیست‌های تخلیص شده از گوساله آلوده شده جهت کنترل ژنتیکی مورد ارزیابی مجدد مولکولی با روش PCR قرار گرفت و همان طور که انتظار می رفت نتایج قبلی تایید و نشان داده شد که اووسیست‌های دفع شده مربوط به *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* بودند.

در تحقیق حاضر روش‌های مختلف خالص سازی اووسیست *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* شامل روش‌های استفاده از آب نمک اشباع، ساکارز اشباع، شیب غلظتی پلکانی فایکل، و شناور سازی با ساکارز ۵۵ درصد اصلاح شده استفاده گردید. با توجه به بالا بودن آلودگی باکتریایی در نمونه‌های مدفوع مورد بررسی، تلاش گردید جهت کاهش باکتری‌های همراه اووسیست‌ها از روش تکمیلی مانند استفاده از بافر لیز کننده باکتری، استفاده از آنتی بیوتیک مناسب و استفاده از فیلتر نیتروسلولزی با سایز منافذ ۳ میکرون جهت جداسازی و تخلیص اووسیست‌ها استفاده شود.

در روش آب نمک اشباع تعدادی از اووسیست‌ها شناور نشدند و همراه اووسیست‌های شناور شده نیز میزان زیادی سلول و باکتری وجود داشت. اووسیست‌های بدست آمده از آن در هر دو روش رنگ آمیزی دارای میزان آلودگی بالا به باکتری‌ها و مواد زائد بودند. میانگین تعداد اووسیست‌های شناور شده و شمارش شده بر روی لام هموسیتومتر در سه تکرار متوالی $۱۰^{۶} \times ۷/۰۸$ در یک میلی لیتر بود. تعداد اووسیست‌هایی که در رسوب باقی مانده و شناور نشدند $۱۰^{۶} \times ۵$ در میلی لیتر بود. تعداد کلونی‌های باکتری شمارش شده در رقت ۱:۱۰۰۰۰، ۱۳۶۰ عدد و در رقت ۱:۱۰۰۰۰۰، ۳۰۴ عدد بود.

در روش ساکارز اشباع تعدادی از اووسیست‌ها شناور نشدند و همراه رسوب میزان قابل توجهی اووسیست مشاهده شد. همچنین میزان زیادی باکتری همراه اووسیست‌های شناور شده مشاهده شد. اووسیست‌های بدست آمده از آن در هر دو روش رنگ آمیزی دارای میزان آلودگی بالا به باکتری‌ها و مواد زائد بودند. میانگین تعداد اووسیست‌های شناور شده و شمارش شده بر روی لام هموسیتومتر در سه تکرار متوالی $۱۰^{۶} \times ۶$ در یک میلی لیتر بود.

در روش شیب غلظتی پلکانی فایکل در لایه مورد نظر (لایه رقت ۰/۵ درصد فایکل) به همراه اووسیست‌ها، باکتری و توده‌های سلولی زیادی وجود داشت. در قسمت رسوب هم علاوه بر باکتری بسیار، میزان قابل توجهی اووسیست وجود داشت. در این روش تفکیک لایه اووسیست‌ها از توده‌های سلولی و باکتری‌ها دشوار بود. اووسیست‌های بدست آمده از این در هر دو روش رنگ آمیزی دارای میزان آلودگی کمتری به باکتری‌ها و مواد زائد در مقایسه با روش ساکارز اشباع و آب نمک اشباع بودند. تعداد اووسیست‌های شمارش شده بر روی لام هموسیتومتر در دو تکرار متوالی $۱۰^{۶} \times ۱۰$ در یک میلی لیتر بود (تصویر شماره ۱).

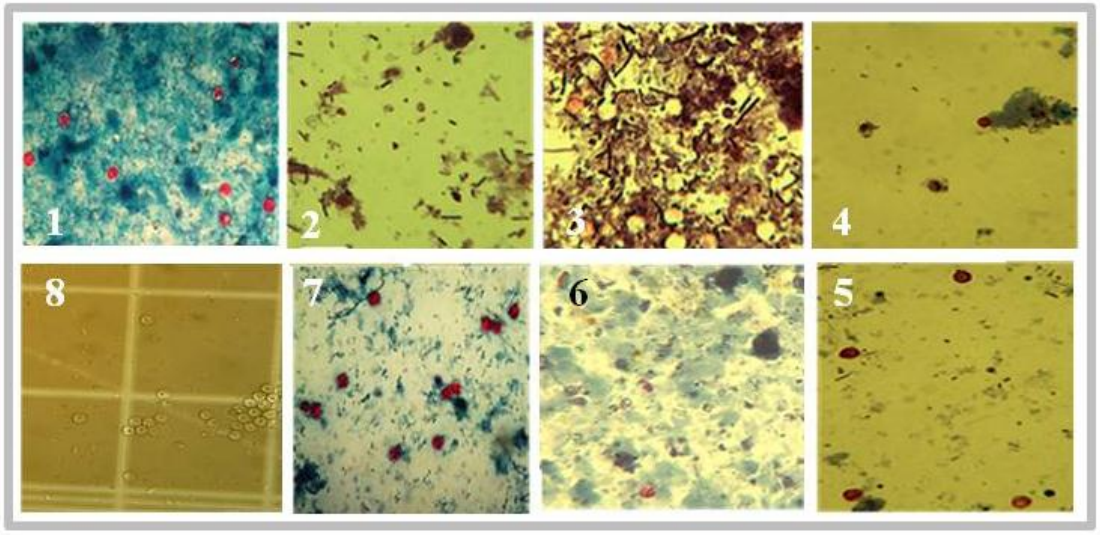
در روش ساکارز اووسیست‌ها به خوبی شناور شدند به طوری که در رسوب آن اووسیست قابل توجهی مشاهده نگردید. میزان باکتری همراه با اووسیست‌های جمع‌آوری شده از این روش کمتر از سایر روش‌ها بود و توده‌های سلولی مشاهده نگردید. باکتری‌ها، توده سلولی و اووسیست‌ها هر کدام در لایه‌های مجزایی شناور شدند. اووسیست‌های بدست آمده از آن در هر دو روش رنگ آمیزی دارای کمترین میزان آلودگی به باکتری‌ها و مواد زائد در مقایسه با سه روش قبل بودند.

Archive of SID

www.SID.ir

میانگین تعداد اووسیست‌های شناور شده و شمارش شده بر روی لام هموسیتومتر در شش تکرار متوالی ۴۰×۱۰^{۶} در یک میلی لیتر بود. تعداد کلونی‌های باکتری شمارش شده در رقت ۱:۱۰۰۰۰ یک عدد بود (تصویر شماره ۱).

به منظور کاهش باکتری‌های همراه با اووسیست‌های تخلیص شده از روش‌های جانبی مانند استفاده از بافر لیز کننده، استفاده از آنتی بیوتیک و فیلتراسیون استفاده شد. استفاده از بافر لیز کننده هر چند باعث از بین رفتن باکتری‌ها شد اما در طی مراحل تخلیص امکان جداسازی لاشه آنها از اووسیست‌ها میسر نشد. در روش استفاده از آنتی بیوتیک سفتراکس، در گسترش‌های رنگ آمیزی شده قبل و بعد از استفاده از آنتی بیوتیک، تغییر شکل باکتری‌ها پس از استفاده از آنتی بیوتیک واضح بود و اووسیست‌ها کمی از اندازه اولیه کوچک‌تر شده بودند و در بررسی میکروسکوپ الکترونی تخریب و تغییر شکل جدار اووسیست‌ها مشاهده گردید (آزمایش الکترون میکروسکوپی در آزمایشگاه دانشکده علوم پزشکی دانشگاه مونیخ آلمان زیر نظر دکتر مهدی شکیبایی انجام شد). در روش استفاده از فیلتراسیون از نظر میزان آلودگی اووسیست‌ها به باکتری، اووسیست‌های روی فیلتر عاری از باکتری، و اووسیست‌های حاصل از شستشوی معکوس فیلتر آلودگی متوسط به باکتری داشتند. در این روش تعداد زیادی از اووسیست‌ها درون فیلتر گیر افتاده و درصد باز یافت اووسیست‌ها ۳۰ درصد محاسبه شد.



تصویر ۱: مقایسه استخراج اووسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم پاروم* به روش ساکارز ۵۵ درصد و شیب غلظتی پلکانی فایکل.

۱- رنگ آمیزی ذیل نلسن اصلاح شده از نمونه مدفوع قبل از خالص سازی. ۲- رنگ آمیزی گرم لایه فایکل ۰/۵ درصد به منظور بررسی باکتری‌های همراه با اووسیست *کریپتوسپوریدیوم پاروم*. ۳- رنگ آمیزی گرم رسوب حاصل از روش فایکل، اجرام کروی به رنگ صورتی کمرنگ و یا بی رنگ اووسیست‌هایی هستند که شناور نشده و در رسوب مشاهده می‌شوند. ۴- رنگ آمیزی ذیل نلسن اصلاح شده از لایه حاوی اووسیست حاصل از روش فایکل را نشان می‌دهد. ۵- رنگ آمیزی ذیل نلسن اصلاح شده از رسوب حاصل از روش فایکل. ۶- رنگ آمیزی ذیل نلسن اصلاح شده از رسوب حاصل از روش ساکارز ۵۵ درصد. ۷- رنگ آمیزی ذیل نلسن اصلاح شده از لایه حاوی اووسیست حاصل از روش ساکارز ۵۵٪ می‌باشد. ۸- اووسیست بعد از تخلیص از طریق فیلتر.

www.SID.ir

تصویر ۲: DNA استخراج شده از اووسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* ابتدا با پرایمرهای اختصاصی (F1, R1) تکثیر داده شدند (باند ۳) و سپس جهت تعیین گونه *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* محصول PCR با پرایمرهای (F2, R1) تکثیر داده شد (باند ۲). باند ۱ ماکر DNA 100bp می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

کریپتوسپوریدیوم تک یاخته‌ای از شاخه اپی کمپلکسا است که لایه مسواکی سلول‌های روده‌ای اکثر مهره‌داران را مورد تهاجم قرار می‌دهد. کریپتوسپوریدیوز در کودکان و افراد دارای نقص سیستم ایمنی اهمیت بسیار دارد. در سال ۱۹۹۳ همه گیری در شهر میلواکی ایالات متحده رخ داد که حدود ۴۰۳ هزار نفر از طریق سیستم آب آشامیدنی شهر آلوده شدند و ۱۱۰ مورد مرگ گزارش گردید (۸ و ۱۶). کازینسکا و همکاران (۲۰۰۵) میزان مرگ و میر ناشی از کریپتوسپوریدیوزیس در افراد با نقص سیستم ایمنی را ۵۰ درصد ذکر کردند. *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* تک یاخته‌ای منتقله از طریق آب و غذا است که در پزشکی و دامپزشکی اهمیت زیادی دارد (۱).

کریپتوسپوریدیوزیس در گاوداری‌ها خسارات زیادی ایجاد می‌کند. گوساله‌های تازه متولد شده به عفونت حساسند و تا ۳۰ بیلیون اووسیست همراه مدفوع دفع می‌کنند. در مطالعه اسکات و همکاران در سال ۱۹۹۴ تا ۱۸۰۰۰ اووسیست در هر گرم مدفوع گاوهای بالغ به ظاهر سالم گزارش شده است. دفع اووسیست‌ها باعث آلودگی محیط و منابع آب سطحی و انتقال آلودگی به سایر دام‌ها و انسان خواهد شد. مطالعات زیادی جهت شناسایی تعداد بسیار اندک اووسیست در مدفوع دام‌ها و محیط به خصوص منابع آب‌های سطحی انجام شده است (۱). ماهیت سخت و مقاوم اووسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم* که به اکثر ضدعفونی کننده‌های متداول مقاومند، دفع مقادیر قابل توجه اووسیست توسط دام‌های بیمار یا حتی به ظاهر سالم که منجر به آلوده سازی محیط می‌شود و عدم وجود درمان

Archive of SID

www.SID.ir

قطعی این تک یاخته را در مرکز توجه محققین قرار داده است. علیرغم اینکه تحقیقات بر روی روش‌های مختلف استخراج اووسیست *کریپتوسپوریدیوم پاروم* از مدفوع و سایر نمونه‌های محیطی از سال‌ها قبل شروع شده است، تلاش‌ها جهت دست یابی به روش‌هایی که علاوه بر بازیافت تعداد بالای اووسیست، منتج به استخراج اووسیست‌هایی عاری از باکتری شود همچنان ادامه دارد. به منظور انجام کشت تک یاخته *کریپتوسپوریدیوم* و مطالعات پروتئومیکس دست یابی به تعداد زیادی اووسیست عاری از باکتری و سایر ناخالصی‌ها ضروری می‌باشد. همچنین کاهش تعداد باکتری‌ها به نگهداری طولانی مدت اووسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم* کمک می‌کند. با توجه به این که اووسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم* استخراج شده از نمونه مدفوع همواره با آلودگی‌های زیادی همراه می‌باشند، لذا روش مورد استفاده باید قادر به حذف این آلودگی‌ها باشد.

مطالعات موجود نشان داده است برای حصول پروتئین‌هایی با کمیت و کیفیت مناسب جهت مطالعات پروتئومیکس *کریپتوسپوریدیوم* حداقل ۲×۱۰^{۶} اووسیست کاملا خالص مورد نیاز است (۱۶). کیفیت اووسیست‌های تخلیص شده از مدفوع علاوه بر استفاده از روش مناسب تخلیص به میزان آلودگی اولیه نمونه مدفوع و روش نمونه برداری از گوساله آلوده بستگی دارد. به این منظور در تحقیقات باید از روش آلوده سازی تجربی گوساله همراه با تجویز آنتی بیوتیک در محیطی تمیز به منظور دستیابی به تعداد بالای اووسیست استفاده نمود. اخذ نمونه از گوساله آلوده باید با آزمایش رکتال و بدون تماس با محیط اطراف انجام شود. بایستی از جمع‌آوری نمونه‌های مدفوع موجود بر روی سطح زمین به شدت خودداری شود. دراین تحقیق علیرغم تلاش بسیار اولین آلوده سازی تجربی گوساله به دلیل آلودگی محیط نگهداری منجر به دفع اووسیست همراه با آلودگی بالا به باکتری گردید. در کشت میکروبی جنس و گونه این باکتری *باسیلوس لیچنیفورمیس* (*Bacillus licheniformis*) تشخیص داده شد و هیچ باکتری از خانواده انتروباکتریاسه رشد نکرد که احتمالا به دلیل اثر بی کرومات پتاسیم بر باکتری‌های انتروباکتریاسه و مقاومت باکتری *باسیلوس لیچنیفورمیس* به بی کرومات پتاسیم بوده است. تلاش‌ها جهت حذف این باکتری در نمونه اووسیست با موفقیت قابل قبولی همراه نبود چرا که در صورت از بین رفتن باکتری در این نمونه‌ها توسط روش‌هایی مانند استفاده از آنتی بیوتیک موثر، شکل اووسیست نیز تغییر می‌کرد و علاوه بر آن حتی در صورت از بین رفتن باکتری، لاشه آن‌ها با هیچ روشی از اووسیست جدا نگردید. حضور لاشه باکتری در تحقیقات پروتئومیکس مشکل ساز خواهد بود.

تا کنون روش‌های مختلفی توسط محققین مختلف به منظور جداسازی اووسیست *کریپتوسپوریدیوم* از مدفوع انجام شده است. شیتر (۱۹۲۳) شناورسازی با استفاده از محلول شیتر (۵۰۰ گرم شکر، ۳۲۰ میلی لیتر آب مقطر و ۹ میلی لیتر فنل) را معرفی کرد (۱۵). گارسیا و همکاران (۱۹۸۳) روش شناورسازی با محلول شیتر را به عنوان بهترین روش برای تشخیص کریپتوسپوریدیوزیس در بیماران ایدزی به آزمایشگاه‌ها توصیه نموده‌اند (۱۵). والدمن و همکاران(۱۹۸۶) از پرکل جهت جداسازی اووسیست‌ها استفاده کردند (۱۲).

آرووود و همکاران(۱۹۸۷) بیان کردند خالص سازی اووسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم* با استفاده از روش

Archive of SID

شناورسازی با محلول شیتر اغلب رضایت بخش نمی‌باشد. اگر چه تعداد اووسیست‌های جدا شده در این روش بالا بود اما آنها همراه با میزان زیادی باکتری و سایر ناخالصی‌های مدفوعی و نیازمند مرحله اضافی خالص سازی بودند. لذا آن‌ها از روش تخلیص همزمان شیب غلظتی منقطع ساکارز و پرکل استفاده کردند و اعلام نمودند بیش از ۳۴ درصد کل اووسیست‌ها به شکل خالص در مرحله شیب غلظتی پرکل جدا شدند و این اووسیست‌ها عفونت زا و عاری از آلودگی‌های میکربی بودند (۴).

در مطالعه حاضر در روش ساکارز اشباع تعدادی از اووسیست‌ها شناور نشدند و همراه رسوب، میزان قابل توجهی اووسیست مشاهده شد. همچنین میزان زیادی باکتری همراه اووسیست‌های شناور شده مشاهده گردید. اووسیست‌های بدست آمده از آن در هر دو روش رنگ‌آمیزی دارای میزان آلودگی بالا به باکتری‌ها و مواد زائد بودند.

کیلانی و همکاران (۱۹۸۷) با استفاده از شناورسازی به کمک شیب غلظتی سزیم کلراید و گرادیانت پرکل اووسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم* را از نمونه مدفوع تخلیص نمودند. آن‌ها اووسیست‌های حاصل از شیب غلظتی پرکل را جهت آزمایشات مولکولی و اووسیست‌های حاصل از سزیم کلراید را جهت آزمایشات بیوشیمیایی و ایمونولوژیکی معرفی کردند (۳ و ۵). این روش به دلیل استفاده از سزیم کلراید گران بوده و مقرون به صرفه نیست. علاوه بر این در این روش از سانتریفوژهای دور بالا استفاده شده که ممکن است همیشه در دسترس نباشند.

آرووود و دونالدسون (۱۹۹۶) با استفاده از شیب غلظتی سزیم کلراید و انجام سانتریفوژ دور بالا (۱۶۰۰۰×g) به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه اقدام به خالص سازی اووسیست‌ها کردند(۱۴). در این مطالعه اووسیست‌های عاری از باکتری استخراج گردید که جهت مطالعات ایمونولوژیکی مناسب ارزیابی شدند.

ملونی و تامپسون (۱۹۹۶) از شیب غلظتی فایکول برای خالص سازی اووسیست‌ها از مدفوع موش استفاده کردند. آن‌ها پس از آلوده سازی تجربی موش‌ها از هر موش طی خالص سازی ۶-۳ میلیون اووسیست استخراج کرده و جهت کشت اووسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* از آن بهره بردند (۱۱).

در مطالعه حاضر در روش شیب غلظتی پلکانی فایکل در لایه مورد نظر (لایه رقت ۰/۵ درصد فایکل) به همراه اووسیست‌ها، باکتری و توده‌های سلولی زیادی وجود داشت. در قسمت رسوب هم علاوه بر باکتری بسیار، میزان قابل توجهی اووسیست وجود داشت. در این روش تفکیک لایه اووسیست‌ها از توده‌های سلولی و باکتری‌ها دشوار بود. اووسیست‌های بدست آمده از این در هر دو روش رنگ آمیزی دارای میزان آلودگی کمتری به باکتری‌ها و مواد زائد در مقایسه با روش ساکارز اشباع و آب نمک اشباع بودند.

آپتون (۱۹۹۷) از معلق سازی بوسیله ساکارز اشباع در استخراج اووسیست‌ها بهره برد و از آنها در کشت سلولی *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* استفاده نمود (۱۶). فایر (۱۳۸۰) معتقد است این روش بسیار سریع بوده و منجر به بازیافت میزان زیادی از اووسیست می‌شود و برای افزایش درصد اووسیست‌های جمع‌آوری شده از رسوب‌ها متعاقب فیلتراسیون آب‌های سطحی مناسب می‌باشد (۲).

لامب و همکاران (۱۹۸۸) از روش شناورسازی توسط محلول نمک برای تخلیص اووسیست‌ها استفاده نمودند (۱۰). آن‌ها از سانتریفوژ شیب چگالی برای

Archive of SID

www.SID.ir

بازیافت اووسیست‌ها استفاده کردند. نتایج مطالعه ما در روش استفاده از محلول نمک طعام اشباع با نتایج مطالعات لامب و همکاران مطابقت نداشت، به طوری که تعدادی از اووسیست‌ها شناور نشدند و همراه اووسیست‌های شناور شده نیز میزان زیادی سلول و باکتری وجود داشت. اووسیست‌های بدست آمده از آن در هر دو روش رنگ آمیزی دارای میزان آلودگی بالا به باکتری‌ها و مواد زائد بودند.

وینتر و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از روش شناورسازی توسط محلول ساکارز ۵۵ درصد سرد شده (با وزن مخصوص ۱/۲۹) موفق به تخلیص میزان نسبتا بالایی از اووسیست‌ها شدند (۲۳). این روش در مطالعه حاضر نیز استفاده شد و منجر به تخلیص ۴۰×۱۰^{۶} اووسیست *کریپتوسپوریدیوم* گردید. در روش ساکارز ٪۵۵ اووسیست‌ها به خوبی شناور شدند به طوری که در رسوب آن اووسیست قابل توجهی مشاهده نگردید. میزان باکتری همراه با اووسیست‌های جمع‌آوری شده از این روش کمتر از سایر روش‌ها بود و توده‌های سلولی مشاهده نگردید. باکتری‌ها، توده سلولی و اووسیست‌ها هر کدام نسبتا در لایه‌های مجزایی شناور شدند.

انترالا و همکاران (۲۰۰۰) از شیب غلظتی پتاسیم برماید (٪۶، ٪۱۶ و ٪۲۸) جهت تخلیص اووسیست بهره بردند. آنها در مطالعه خود پتاسیم برماید را به عنوان ماده‌ای در دسترس و ارزان معرفی کردند و عنوان نمودند پرکل و سزیم کلراید علاوه بر سختی در انجام، گران نیز می‌باشند (۵).

ترانگ و همکاران (۲۰۰۶) جهت تخلیص اووسیست *کریپتوسپوریدیوم* به مقایسه ۶ روش پرداختند. روش‌های سوسپانسیون ساکارز، شناورسازی با ساکارز، گرادیانت پرکل همراه شناورسازی با ساکارز، سزیم کلراید، گرادیانت فایکول، روش گرادیانت منقطع ساکارز و گرادیانت پرکل روش‌های مورد مطالعه آن‌ها بودند. آن‌ها بر اساس نتایج فلوسایتومتری و کشت سلول اعلام نمودند، روش‌های سوسپانسیون ساکارز (۶۹/۵۵ درصد بازیافت اووسیست با روش شناسایی فلوسایتومتری)، شناورسازی با ساکارز و گرادیانت پرکل همراه شناورسازی با ساکارز (۳۰/۲۷ درصد بازیافت اووسیست با روش شناسایی فلوسایتومتری) به ترتیب بالاترین بازیافت اووسیست را دارند. آن‌ها گزارش نمودند که روش‌های سزیم کلراید، شیب غلظتی منقطع ساکارز و شیب غلظتی پرکل و شیب غلظتی فایکول توانایی تخلیص تعداد کمی اووسیست را دارند. میزان آلودگی باکتری در روش شیب غلظتی پرکل همراه شناورسازی با ساکارز $۳/۳۳\times۱۰^{۲}\pm۰/۶۷\times۱۰^{۲}$، شناورسازی با ساکارز $۶/۷۰\times۱۰^{۶}\pm۰/۱۵\times۱۰^{۶}$، سوسپانسیون ساکارز $۱۲/۱۳\times۱۰^{۶}\pm۰/۱۲\times۱۰^{۶}$، سزیم کلراید $۱۴/۲۲\times۱۰^{۶}\pm۰/۰۶\times۱۰^{۶}$ ذکر گردید. اووسیست‌های تخلیص شده به روش شیب غلظتی پرکل همراه شناورسازی با ساکارز کمترین آلودگی به باکتری را نشان دادند (۱۶). نتایج مطالعه ما در مورد کشت باکتری با تحقیقات ترانگ و همکاران هم خوانی نداشت که احتمالا به خاطر استفاده از بی کرومات پتاسیم در مطالعه ما می‌باشد.

اُبرن و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از شناورسازی با محلول نمک طعام (وزن مخصوص ۱/۱۲، ۳۶۰ گرم در لیتر) بر روی نمونه‌هایی که آلودگی اولیه کمی داشتند، تعداد $۱/۹ \times ۱۰^{۹}\pm ۰/۷\times۱۰^{۹}$ اووسیست *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* به دست آوردند. قبل از تیمار با اتر تعداد $۲/۵ \times ۱۰^{۴}$ در هر میلی لیتر کلونی باکتری شمارش گردید ولی پس از تیمار با اتر باکتری رشد نکرد. با توجه به این که در بیشتر موارد منبع تهیه

Archive of SID

www.SID.ir

اووسیست نمونه مدفوع می‌باشد که معمولا همراه با آلودگی بالایی به باکتری است این روش، کاربردی در این نمونه‌ها نخواهد داشت (۱۲). نتایج مطالعات ما با نتایج این مطالعه هم خوانی نداشت که می‌تواند به علت بالاتر بودن آلودگی باکتریایی نمونه مدفوع مورد استفاده در تحقیق ما باشد.

یافته‌های تحقیق حاضر با یافته آرووود و همکاران (۱۹۸۷) مطابقت دارد و با نظر گارسیا و همکاران (۱۹۸۳) که روش شناورسازی با محلول شیتر را رضایت بخش توصیف کردند مطابقت ندارد. روش شیب غلظتی فایکل از نظر خلوص اووسیست نتایج مطلوبی در پی نداشت ضمن این که فایکول ماده‌ای گران‌تر از ساکارز است و همیشه در هر آزمایشگاهی در دسترس نمی‌باشد. روش استفاده از ساکارز ۵۵ درصد ضمن شناورسازی تعداد زیادی اووسیست خالص ترین اووسیست را در مقایسه با سایر روش‌ها ایجاد کرد.

کومپاپونگ و همکاران (۲۰۰۹) از شناورسازی با ساکارز (وزن مخصوص ۱/۱۸) و مقایسه آن با روش ایمونومگنتیک جهت تخلیص اووسیست‌ها استفاده کردند. آن‌ها شناورسازی با ساکارز را پیشنهاد و آن را ارزان و مناسب معرفی و روش ایمونومگنتینگ را گران ذکر کردند (۸). در روش ایمنومگنتیک آنتی بادی ضد آنتی ژن‌های سطحی اووسیست *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* به ذرات مغناطیسی متصل می‌شود و اووسیست‌ها به کمک مگنت از محلول جدا می‌شوند. کیفیت ذرات بستر و ویژگی و میل ترکیبی آنتی بادی‌ها به انگل می‌تواند از عوامل محدودکننده در این روش باشد. هر چه میل ترکیبی آنتی بادی متصل شده به بستر، به اووسیست بیشتر باشد اووسیست با قدرت بیشتری به بستر متصل می‌شود و ممکن است این قدرت اتصال مانع رها شدن اووسیست در مرحله جداسازی نهایی شود. اندازه ذرات بستر و روش تکان دادن ممکن است بر میزان اتصال اووسیست به آن اثر داشته باشد. تکان‌های افقی بالاترین بازیافت اووسیست را موجب شده در صورتی که تکان دایره‌ای باعث تجمع ذرات مغناطیسی در مرکز و کاهش سطح تماس با اووسیست می‌شود (۸).

در این تحقیق مشخص گردید هیچ یک از چهار روش انجام شده توانایی تخلیص و جداسازی کامل اووسیست‌ها از باکتری و سایر ناخالصی‌ها را نداشت، لذا برای دست یابی به اووسیست خالص به منظور تهیه آنتی ژن از روش فیلتراسیون استفاده گردید. بهترین نتیجه در چهار روش مقایسه در این تحقیق روش استفاده از ساکارز ۵۵ درصد ارزیابی گردید که به طور متوسط منجر به تخلیص ۴۰ میلیون اووسیست در میلی لیتر گردید و کمترین آلودگی باکتریایی همراه با اووسیست‌های تخلیص شده در این روش مشاهده گردید. ارزان و دردسترس بودن ساکارز از مزایای دیگر این روش است که موجب گردید تعداد زیادی اووسیست نسبتا تمیز با هزینه کم جداسازی شوند. استفاده از اتر و بافر Tris-EDTA در کاهش چربی و همگن سازی مدفوع نقش بسزایی داشت. لذا در قدم اول در این مطالعه با استفاده از محلول ساکارز ۵۵ درصد بر روی نمونه مدفوع اقدام به تخلیص اولیه اووسیست‌ها گردید و اووسیست‌های حاصل از این روش جهت زدودن هر چه بیشتر باکتری‌ها از فیلتر نیتروسلولزی عبور داده شد. محلول‌ها و وسایل مورد استفاده در مراحل فیلتراسیون استریل گردید تا احتمال حضور آلودگی‌های خارجی حذف شود. پس از فیلتراسیون هیچ جرمی غیر از اووسیست‌ها روی فیلتر قرار نداشتند. لاشه باکتری‌ها و جرم‌های همگن شده و خرد شده از منفذ ۳ میکرونی عبور کردند. در کشت

Archive of SID

www.SID.ir

باکتریایی نمونه اووسیست تخلیص شده به روش ساکارز ۵۵ درصد هیچ باکتری رشد نکرد، هرچند لاشه باکتری‌ها به وضوح زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردید علت این امر می‌تواند استفاده از بی کرومات پتاسیم به عنوان نگهدارنده مدفوع و اتر در روش تخلیص مورد استفاده باشد. همان طور که انتظار می‌رفت در کشت باکتریایی نمونه اووسیست تخلیص شده به روش فیلتراسیون نیز هیچ باکتری رشد نکرد.

مطالعه حاضر نشان داد که جهت تخلیص اووسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* از نمونه‌های حاوی مقدار زیاد اووسیست، روش شناورسازی بر اساس محلول ساکارز ۵۵ درصد و روش تکمیلی استفاده از فیلترهای نیتروسلولزی ۳ میکرون می‌تواند مناسب باشد. پیشنهاد می‌شود که در نمونه‌هایی که میزان چربی بالایی دارند، حتما از اتر جهت چربی زدایی و همگن سازی استفاده گردد. همچنین به منظور تخلیص اووسیست از نمونه‌های حاوی مقدار کمی اووسیست بهتر است به منظور جداسازی اولیه اووسیست‌ها از محلول ساکارز ۵۵ درصد و به عنوان روش تکمیلی از روش‌های پیشرفته مانند ایمونوکروماتوگرافی با درصد بازیافت بیشتر اووسیست استفاده نمود.

تشکر

هزینه‌های اجرای این مطالعه از محل اعتبارات طرح کلان ملی واکسن دام، طیور و آبزیان و طرح قطب علمی ایمونوپاتولوژی تامین گردید، بدینوسیله محققین این مطالعه تشکر خود را از مسئولین مربوطه ابراز می‌دارند.

منابع

۱. ابراهیم زاده، ا. (۱۳۸۶). شناسایی و تهیه پروتئین نوترکیب p23 *کریپتوسپوریدیوم پاروووم*. رساله دکترای تخصصی انگل شناسی، شماره ۲۹۶. دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

۲. فایر، ر. ترجمه یگانی، م. زیر نظر تقی پوربازرگانی، ت. و رزمی، غ.ر. (۱۳۸۰). *کریپتوسپوریدیوم و کریپتوسپوریدیوز*. چاپ اول. انتشارات نوربخش، تهران.

3. Arrowood, M.J., Donaldson, K. (1996). Improved purification methods for calf derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. *Journal of Eukaryot Microbiology* **43** :89.
4. Arrowood, J.M., Sterling, R.CH. (1987). Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporoziote using discontinous sucrose and isopycnic percoll gradients. *Journal of Parasitology* **73**: 314-9.
5. Entrala, E., Molina-Molina, J., Rosales-Lombardo, M., Sanchez-Moreno, M., Mascaro-Ilazcano, C. (2000). *Cryptosporidium parvum*: oocysts purification using potassium bromide discountinuos gradient. *Veterinary Parasitology* **92**: 223-6.
6. Garcia, L.S., Bruckner, D.A., Brewer, T.C., Shimizu, R.Y. (1983). Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **18**: 185–90.
7. Kuczynska, E., Shelton, D.R., Pachepsky, Y. (2005). Effect of bovine manure on *Cryptosporidium parvum* oocyst attachment to soil. *Applied and Environmental Microbiology* **71:** 6394-7.
8. Kilani, R.T., Sekla, L. (1987). Purification of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites by cesium choloride and percoll gradient. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **36**: 505-8.

Archive of SID

www.SID.ir

9. Koompapong, K., Sutthikornchai, C.H., Sukthana, Y. (2009). *Cryptosporidium* oocyst detection in water samples: Flotation technique enhanced with immunofluorescence is as effective as immunomagnetic sepration method. *Korean Journal of Parasitology* **47**: 353-7.
10. Liao, S.H.F., DU, C.H., Yang, S.H., Healey, M.C. (2001). Alteration of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Eucoccidiorida) oocyst antigens following bleach treatment. *Acta Protozoologica* **40**: 273-9.
11. Lumb, R., Lanser, J.A., O'Donoghue, P.J. (1988). Electrophoretic and immunoblot analysis of *Cryptosporidium* oocysts. *Immunology and Cell Biology* **66**: 369-76.
12. McCuin, R.M., Clancy, J.L. (2005). Methods for the recovery, isolation and detection of *Cryptosporidium* oocysts in wastewaters. *Journal of Microbiological Methods* **63**: 73-88.
13. Meloni, B.P., Thompson, R.C. (1996). Simplified methods for obtaining purified oocysts from mice and for growing *Cryptosporidium parvum* in vitro. *Journal of Parasitology* **82**: 757-62.
14. Merry, R.J. (1997). Viability of *Cryptosporidium parvum* during ensilage of perennial ryegrass. *Journal of Applied Microbiology* **82**: 115–20.
15. O'Brien, C.N., Jenkins, M.C. (2007). A rapid method for producing highly purified *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Parasitology* **93**: 434–6.
16. Rosales, M.J., Lazcano, C.M., Arnedo, T., Castilla, J.J. (1994). Isolation and identification of *Cryptosporidium parvum* oocysts with continuous percoll gradients and combined alcian blue-giemsa staining. *Acta Tropica* **56**: 371-3.
17. Scott, C.A. Smith, H.V., Gibbs, H.A. (1994). Excretion of *Cryptosporidium parvum* oocysts by a herd of beef suckler cows. *Veterinary Record* **134**: 172.
18. Sheather, A.L. (1923). The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *Journal of Comparative Pathology* **36**: 266-275.
19. Truong, Q., Ferrari, B.C. (2006). Quantitative and qualitative comparisons of *Cryptosporidium* faecal purification procedures for the isolation of oocysts suitable for proteomic analysis. *International Journal for Parasitology* **36**: 811-9.
20. Upton, S.J. (1997). *In vitro cultivation*. In: Fayer, R. (Ed.) *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. *CRC Press*, Boca Raton, FL: 181–207.
21. Waldman, E., Tzipori, S., Forsyth, J.R. (1986). Separation of *Cryptosporidium* species oocysts from feces by using a percoll discontinuous density gradient. *Journal of Clinical Microbiology* **23**: 199-200.
22. Winter, G., Andrew, A.G., Williams, L.K., Slade, M.B. (2000). Characterization of a major sporozoite surface glycoprotein of *Cryptosporidium parvum*. *Functional and Integrative Genomics* **1**: 207-17.
23. Wooley, R.E., Jones, M.S. (1983). Action of EDTA-TRIS and antimicrobial agent combination on selected pathogenic Bacteria. *Veterinary Microbiology* **8**: 271-80.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 8, Issue 2, 2012

Presenting an Appropriate Method for Isolation of Bacteria Free *Cryptosporidium parvum* Oocysts

Shayan, P.[1]*, Asghari, Z.[1], Ebrahimzadeh, E.[1], Omidian, Z.[1], Zarghami, F.[1]

1- Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received Date: 5 Jan 2013 *Accepted Date: 9 Feb 2013*

Abstract

Cryptosporidium parvum is a zoonotic protozoan which causes disease in immunocompromised patients and newborn animals especially calves. The oocysts excreted by infected animals are introduced into the environment and water. Since the low number of oocyst can cause infection and there is no effective disinfectant against cryptosporidium, the investigation dealing with the cryptosporidiosis is of growing interest among many researchers. Therefore, they try to improve the existing isolation methods of C. parvum oocysts even in environmental samples with small number of oocysts, to obtain much purified oocysts for immunological and molecular studies. Different methods have gained some success on the isolation of cryptosporidium, but they didn't result in obtaining completely pure oocysts. The aim of the present study was to try to develop an isolating system for bacteria free oocysts. For this aim, four flotation methods have been used to isolate the C. parvum oocysts from the feces, including NaCl floatation, sucrose floatation, ficoll gradient and 55% sucrose floatation. A floatation method based on 55% sucrose was evaluated as the best method for the primary isolation of Cryptosporidium oocytes. The nitrocellulose filter (with 3µm pore size) was used to remove bacteria and other contaminants. Our results suggest that the oocysts isolated using filtration were free of bacteria and the amount of pure oocysts was 30%. Although the amount of isolated oocysts was limited, the isolated pure oocysts can be used for proteomics studies.

Keywords: *Cryptosporidium parvum, Oocyst, Floatation, Filtration*

**Corresponding author: Shayan, P.*
Address: Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
Tel:021-61117094
Email: pshayan@ut.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir