جداسازی و تخلیص اووسیست ها و اسپروزوئیت های کریپتوسپوریدیوم با استفاده از روشهای گرادیانت منقطع ساکارز و گرادیانت پرکول

*دکتر داود درستکار مقدم ، **مهدی اعظمی

*استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

**کارشناس ارشد انگل شناسی، گروه انگل شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

تاریخ دریافت مقاله: ۸۳/۷/۲۰ ، تاریخ پذیرش مقاله: ۸۴/۱/۲۵

خلاصه

کریپتوسپوریدیوم یکی از انگل های داخل سلولی اجباری از شاخه اپی کمپلکسا است که در جهان به عنوان عامل بیماری گاستروآنتریت در میزبانان پستاندار از جمله انسان شناخته شده است. در مراحل اولیه بیماری، کریپتوسپوریدیوم باعث عفونت سلولهای اپی تلیال روده و معده می شود و در نتیجه شکل های مختلفی از بیماری را به صورت اسهال حاد، اسهال های خود محدود شونده و موارد مرگ و میر و شدید بیماری را در مبتلایان به نقص سیستم ایمنی به ویژه مبتلایان به سندرم نقص ایمنی اکتسابی (ایدز) ایجاد می نماید. با توجه به اهمیت بهداشتی این انگل در جهان، جداسازی و تخلیص این انگل جهت شناسایی خصوصیات آنتی ژنیک و تعیین سویه های مختلف آن ضروری به نظر می رسد.

در مطالعه حاضر، تعداد ۴۸۰ نمونه مدفوع از گوساله های استان اصفهان جمع آوری و با روش شناورسازی در محلول قندی (Scheater) و رنگ آمیزی اسید فاست اصلاح شده مورد بررسی قرار گرفتند که از این تعداد، ۳۰ نمونه آلوده به انگل تشخیص داده شد. نمونه های مدفوع آلوده با روش گرادیانت منقطع ساکارز تخلیص شد و در دی کرومات پتاسیم ۲/۵٪ نگهداری شدند.

تکنیک های به کار گرفته شده جهت جداسازی و تخلیص اووسیست ها و اسپروزوئیت های کریپتوسپوریدیوم از نمونه های به دست آمده در اندازه بسیار زیاد، شامل روش های گرادیانت منقطع ساکارز و گرادیانت پرکول بود. با این روش ها، اووسیست های انگل با انجام دو مرحله گرادیانت منقطع ساکارز و یک مرحله گرادیانت پرکول جداسازی و تخلیص شدند. اووسیست های جدا شده عاری از هر گونه ناخالصی و باکتری بودند و ۳۴٪ از نمونه های جمع آوری شده اصلی را شامل می شدند.

اسپروزوئیت های انگل بوسیله یک مرحله گرادیانت پرکول از مخلوط اووسیست های در حال تخریب جداسازی شدند. ۶۳٪ از اسپروزوئیت های اصلی جدا شده با ۲/۲٪ از اووسیست های دست نخورده و اووسیست های بدون دیواره همراه بودند. اسپروزوئیت های جداسازی شده جهت آزمایشات ELISA، آنالیز آنتی ژن به وسیله SDS-PAGE و وسترن بلات (Westernblot) و نیز برای تجزیه اسید نوکلئیک (DNA) مناسب می باشند.

کلمات کلیدی: کریپتوسپوریدیوم، گرادیانت منقطع ساکارز، گرادیانت پرکول.

مقدمه

مطالعات آزمایشگاهی انجام گرفته بر روی بیولوژی کریپتوسپوریدیوم و پاسخ های ایمنی در میزبانان مبتلا به کریپتوسپوریدیوز نشان داده است که تکنیکهای آزمایشگاهی جهت جداسازی و تخلیص اووسیست و اسپروزوئیت های این انگل از آلودگی های مدفوعی در مقیاس وسیع ناکافی می باشند. اخیراً از روشی جهت جداسازی اووسیست های کریپتوسپوریدیوم از اووسیست سایر کوکسیدیاها استفاده شده است که این روش بر اساس شناورسازی نمونه مورد بررسی در محلول قندی(Scheather's flotation) عمل می نماید (۱ ، ۱۰). سایر روشهای موجود که بر پایه روشهای تغلیظی عمل می نمایند، اووسیست های موجود در نمونه را جهت بررسی و تشخیص نهایی تغلیظ می کنند که همگی این روشها اثرات کشنده بر روی اووسیست های انگل داشته و مناسب محسوب می شوند.

اولین بار جهت جداسازی اووسیست های زنده از نمونه های مدفوع از تکنیک شناورسازی نمونه در محلول شیتر استفاده شده است (۷). اما اووسیست هایی که با این روش جداسازی

نویسنده مسئول: دکتر داوود درستکار مقدم، تلفن: ۲۴۹۱ ۷۹۲-۰۳۱۱ ، نمابر: ۸۵۹۷ ۶۸۸-۰۳۱۱ ، E.mail:moghaddam@med.mui.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

می‌شوند حاوی باکتریها و سایر ناخالصی ها از جمله ارگانیسمهایی هستند که ممکن است در محیط کشت آزمایشگاهی کریپتوسپوریدیوم آلودگی ایجاد نموده و مانع از رشد انگل شوند. علاوه بر این، به دلیل اینکه جداسازی اووسیست ها و اسپروزوئیت های انگل در جهت تهیه آنتی ژن و یا آنالیز DNA انجام می گیرد، وجود آلودگی هر چند به میزان بسیار ناچیز، اثرات بسیار شدیدی را بر روی نتایج اعمال می کند.

Waldman با استفاده از بافر فسفات سالین ـ اتر و روش gradient centrifugation method توانسته است اووسیست های کریپتوسپوریدیوم را از نمونه های مدفوع جداسازی نماید (۱۶). گزارشات دیگری نیز مبنی بر جداسازی اووسیست ها با استفاده از روش شیب چگالی ساکارز (۸)، ستونهای ویژه با گلوله های شیشه‌ای (۹)، شیب منقطع برومید پتاسیم (۴)، شناورسازی با کلرید سدیم (۲)، استفاده از فیکل (۱۳) و سولفات روی (۱۴) وجود دارد. اما در هیچکدام از این گزارشات در مورد جداسازی انگل به میزان بسیار زیاد اشاره ای نشده است. همچنین هیچکدام از این روشها در آزمایشگاهها ارزیابی نشده اند. هدف از این بررسی، ارائه تکنیکی مناسب جهت جداسازی و تخلیص اووسیست و اسپروزوئیت های زنده کریپتوسپوریدیوم در مقیاس زیاد می باشد.

مواد و روش کار

جمع آوری و شناسایی نمونه های آلوده: تعداد ۴۸۰ نمونه مدفوع به طور مستقیم از رکتوم گاوها و گوساله های مناطق مختلف استان اصفهان جمع آوری شد. نمونه های جمع آوری شده با حجم مساوی دی کرومات پتاسیم ۵٪ مخلوط و در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور بررسی وجود یا عدم وجود کریپتوسپوریدیوم، تمامی نمونه ها با روش آزمایشگاهی شناورسازی با محلول قندی (شیتر) تغلیظ شدند و در نهایت گسترشهای تهیه شده با روش ذیل ـ نلسون اصلاح شده رنگ آمیزی و با میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند.

نمونه های آلوده به انگل (۳۰ نمونه) با استفاده از فیلترهای مخصوص با سوراخهایی به قطر ۶۳ میکرون غربالگری و صاف شدند و ذرات و ناخالصی های درشت نمونه ها جدا گردید. تمامی نمونه های صاف شده را در یک ظرف ریخته و در حدود ۲۰۰ میلی لیتر از آن در لوله های سانتریفوژ پلاستیکی مخصوص به مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۱۵۰۰ سانتریفوژ شده، رسوب حاصل در دی کرومات پتاسیم ۲/۵٪ سوسپانسیون و در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جداسازی اووسیست ها با استفاد از روش گرادیانت منقطع ساکارز: تکنیک گرادیانت منقطع ساکارز برای جداسازی و تخلیص اولیه اووسیست های کریپتوسپوریدیوم بر اساس شناورسازی نمونه در محلول قندی بنا شده است. با مخلوط نمودن ۳۲۰ میلی لیتر آب مقطر، ۵۰۰ گرم ساکارز و ۹ میلی لیتر فنل محلول شیتر (Scheather's) تهیه شد. با اضافه کردن بافر فسفات سالین ۰/۰۲۵ مولار و ۱٪ Tween80 از محلول فوق دو رقت ۲: ۱ با وزن مخصوص ۱/۱۰۳ و۴: ۱ با وزن مخصوص ۱/۰۶۴ تهیه شد. ۱۰ میلی لیتر از محلول با رقت ۲: ۱ را در یک لوله سانتریفوژ پلی پروپیلنی ۵۰ میلی لیتری ریخته و بر روی آن ۱۰ میلی لیتر از محلول با رقت ۴: ۱ اضافه شد. ۵ میلی لیتر از نمونه مدفوع صاف شده که در دی کرومات پتاسیم نگهداری می شد بر روی محلول رویی (رقت ۴: ۱) اضافه شد. در هر سانتریفوژ ۱۶ لوله قرار داده شد و لوله ها به مدت ۳۰ دقیقه با دور g ۱۵۰۰ سانتریفوژ شدند. پس از سانتریفوژ در هر لوله چهار لایه تشکیل شد که از بالا به پایین به این ترتیب بودند: مواد زائد و ناخالصی های مدفوع، محلول رقیق ۴: ۱، محلول رقیق ۲: ۱ و لایه رسوب. هر لایه با دقت جدا و لایه رسوب نیز از نظر وجود اووسیست مورد بررسی قرار گرفت. مخلوط لایه های ۲: ۱ و ۴: ۱ با بافر فسفات سالین ۰/۸۵ درصد رقیق شد. لوله های حاوی محلول رقیق شده، سانتریفوژ و مایع رویی دور ریخته شد. با وارد کردن رسوب های جمع آوری شده در ۴۰ میلی لیتر دی کرومات پتاسیم ۲/۵٪ یک سوسپانسیون تهیه شد. مانند مراحل قبل، ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون تهیه شده را بر روی محلولهای رقیق ۲: ۱ و ۴: ۱ در یک لوله جدید ریخته و سانتریفوژ شد. در پایان رسوب حاصل که حاوی اووسیست های انگل می باشد با ۴ میلی لیتر دی کرومات پتاسیم ۲/۵٪ مخلوط شد.

جداسازی و تخلیص اووسیست ها با استفاده از گرادیانت پرکول: با مخلوط کردن ۹ قسمت پرکول، ۱ قسمت 10× Alsever's و ۹ قسمت 1× Alsever's، محلول پرکول با وزن مخصوص g/ml ۱/۰۹ تهیه شد. یک میلی لیتر از اووسیست های به دست آمده از مرحله دوم روش گرادیانت منقطع ساکارز بر روی ۹ میلی لیتر محلول پرکول اضافه شد و

Archive of SID

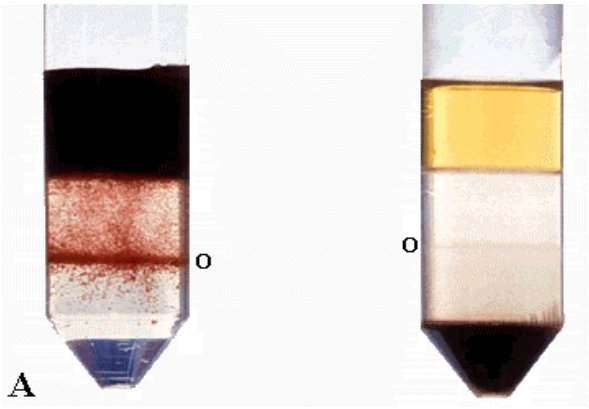
www.SID.ir

لوله ها به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت اتاق و با سرعت ۲۲۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند. پس از سانتریفوژ در بالای لوله باکتریهای موجود در نمونه و در پایین لوله اووسیست ها قرار گرفتند. لایه مربوط به اووسیست ها با بافر PBS شسته شده و از نظر وجود اووسیست یا ناخالصی مورد بررسی قرار گرفت. اووسیست های جداسازی شده با این تکنیک در دی کرومات پتاسیم ۲/۵٪ و در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

جداسازی و تخلیص اسپروزوئیت ها: اووسیست‌های به دست آمده به کمک پرکول با PBS شستشو داده شد. عملیات شستشو سه بار، هر بار ۱۰ دقیقه و با دور ۱۵۰۰g انجام می شد. اووسیست های به دست آمده از مرحله آخر شستشو در ۲۰ میلی لیتر PBS به صورت تعلیق درآورده شد به طوری که در هر میلی لیتر از این سوسپانسیون ^{8} ۱۰× ۲-۱ اووسیست انگل وجود داشت. سپس سوسپانسیون اووسیست ها با حجم مساوی از ماده استخراج کننده اسپروزوئیت (ترپسین ۰/۵٪، سدیم تائوروکلات محلول در PBS ۱/۵ درصد) مخلوط شده و به مدت ۶۰ ـ۴۰ دقیقه در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۵). بعد از این مرحله با کمک محلول Alsever's سوسپانسیون را شستشو داده و محلول استخراج موجود در آن حذف گردید. با وارد نمودن رسوب اسپروزوئیت های آزاد، دیواره اووسیستها و اووسیست های سالم در ۴ میلی لیتر محلول 1× Alsevar's سوسپانسیون جدیدی تهیه گردید. ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون جدید بر روی ۹ میلی لیتر محلول پرکول اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه و با دور ۲۲۰۰۰ g سانتریفوژ شد. باندهایی که پس از سانتریفوژ تشکیل شد با PBS شسته و از نظر حضور اسپروزوئیت‌های خالص، دیواره اووسیست ها و ناخالصی ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

در شکل ۱ (A) لایه مربوط به اووسیست های نمونه را که با روش گرادیانت منقطع ساکارز تشکیل شده است می توان مشاهده نمود. مراحل جداسازی و تخلیص اووسیست ها و اسپروزوئیت های کریپتوسپوریدیوم نیز در شکل های ۲ و ۳ نشان داده شده اند. هر مرحله از تکنیکهای یاد شده بدون اینکه به اووسیست ها آسیبی وارد کنند انجام می شوند. تعداد اووسیست های موجود در نمونه که با روشهای گرادیانت منقطع ساکارز و گرادیانت پرکول جداسازی می شوند در شکل ۵ و بازدهی هر یک از روشها در خالص سازی اووسیست ها در شکل ۶ نشان داده شده است.



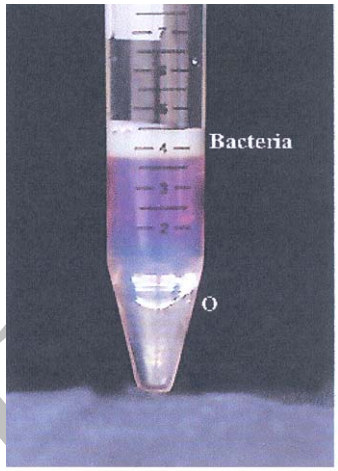
شکل ۱: A . (لوله سمت چپ): مرحله اول روش گرادیانت منقطع ساکارز بر روی نمونه مدفوع صاف شده را نشان می دهد. ناخالصی های نمونه در بالای لوله و در سطح لایه رقیق ٤: ۱ و اووسیستها (O) در حد فاصل لایه های رقیق ۲: ۱ و ٤: ۱ قرار گرفته اند. (لوله سمت راست): مرحله دوم گرادیانت منقطع ساکارز بر روی اووسیست های به دست آمده از مرحله اول را نشان می دهد.

در مرحله اول گرادیانت منقطع ساکارز، عمدتاً ۶۱٪ از اووسیست های بدون آلودگی در حد فاصل بین لایه های ۲: ۱ و ۴: ۱ قرار می گیرند (شکل ۱). تقریباً ۱۰٪ از اووسیست هایی که از لایه با رقت ۲: ۱جداسازی می شوند نیز دارای آلودگی با مواد زائد و باکتریهای مدفوع می باشند. بقیه اووسیست ها نیز یا در طی شستشو از نمونه حذف شده و یا در هنگام سانتریفوژ ته نشین شده و در لایه رسوب قرار می گیرند. در مرحله دوم گردایانت منقطع ساکارز ۷۲٪ از اووسیست ها جداسازی می شوند و این در حالی است که با انجام روش گرادیانت پرکول ۷۷٪ از اووسیست ها جداسازی می شوند.

بعد از انجام مرحله اول گرادیانت منقطع ساکارز، جدا کردن اووسیست ها از ناخالصی ها و باکتریهای موجود در مدفوع خیلی راحت تر انجام می شود. شکل ۱ نشان می دهد که اووسیست های انگل در حد فاصل لایه با رقت ۲: ۱ و ۴: ۱ قرار می گیرند اما ناخالصی ها و باکتریهای موجود در نمونه در سطح و قسمتی از لایه ۴: ۱ واقع می شوند. اووسیست هایی که از مرحله دوم گرادیانت منقطع ساکارز جدا می شوند حاوی مقدار کمی از باکتریهای موجود در مدفوع می باشند اما با

Archive of SID
www.SID.ir

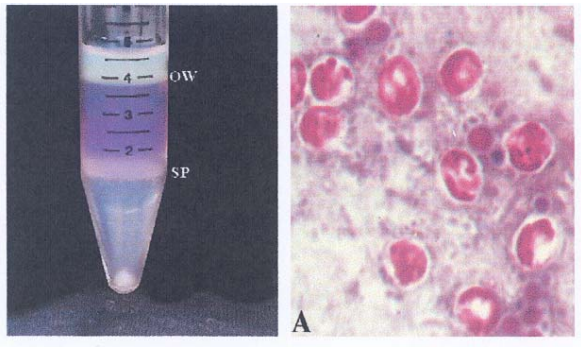
انجام روش گرادیانت پرکول اووسیست ها به طور یکدست از باکتریها و ناخالصی ها پاکسازی می شوند (شکل ۲).



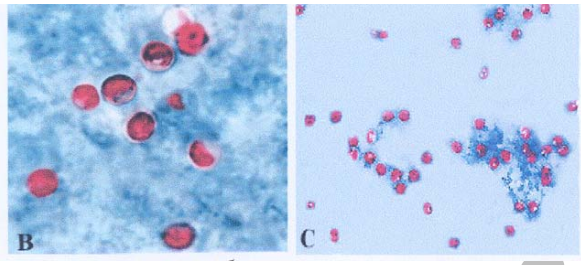
شکل ۲: متد گرادیانت پرکول را بر روی اووسیست های تقریباً خالص شده به دست آمده از مرحله دوم روش گرادیانت منقطع ساکارز نشان می‌دهد. باکتریهای جدا شده در بالا و اووسیست ها (O) در پایین لوله مشاهده می شوند.

اووسیست های به دست آمده از مرحله گرادیانت پرکول را به مدت ۱۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ سرد تماس داده و در نهایت آنها را در محیط TSB (Trypticase soy broth) وارد کردیم. محیط کشت TSB حاوی انگل به مدت ۱ هفته در ۳۷ درجه نگهداری شد. نکته جالب توجه این است که با نگهداری اووسیست ها در دی کرومات پتاسیم ۲/۵٪ احتمال رشد باکتریها و سایر میکروارگانیسمها وجود دارد در حالیکه تماس اووسیست ها با هیپوکلریت سدیم باعث جلوگیری از رشد میکروارگانیسمها در محیط کشت TSB می شود. در بررسی حاضر نیز بعد از ۱ هفته از تعلیق اووسیست ها در محیط کشت TSB هیچ میکروارگانیسمی مشاهده نشد. بررسی زنده بودن و عفونت زایی اووسیست های جدا شده با تلقیح موفقیت آمیز ۱۰۰۰۰ اووسیست به موشهای BALB/c اثبات شد.

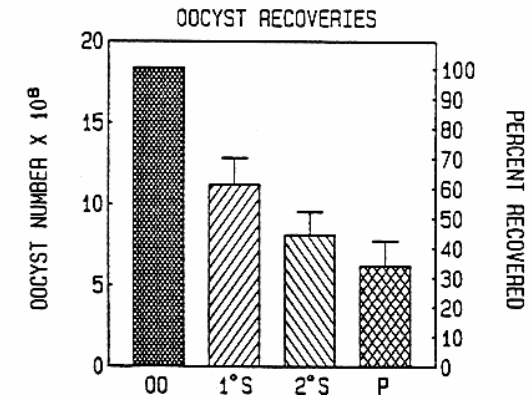
لایه های مربوط به اسپروزوئیت ها و دیواره اووسیست ها که به کمک روش گرادیانت پرکول جدا شده اند، در شکل۳ نشان داده شده است. اووسیتست های جدا شده با روش گرادیانت منقطع ساکارز در شکل ۳A و اووسیست های تخلیص شده به کمک روش گرادیانت پرکول در شکل (B و C) ۴ نشان داده شده اند.



شکل ۳: روش گرادیانت پرکول را بر روی اووسیست هایی که قبلاً با ماده استخراج کننده اسپروزوئیت مخلوط شده اند، نشان می دهد. دیواره اووسیست های انگل (OW) در بالا و اسپروزوئیت ها (SP) در پایین لوله دیده می شوند. A. اووسیست های جدا شده به کمک روش گرادیانت منقطع ساکارز.



شکل ٤: (B و C) اووسیست های به دست آمده از مرحله گرادیانت پرکول را نشان می‌دهد.

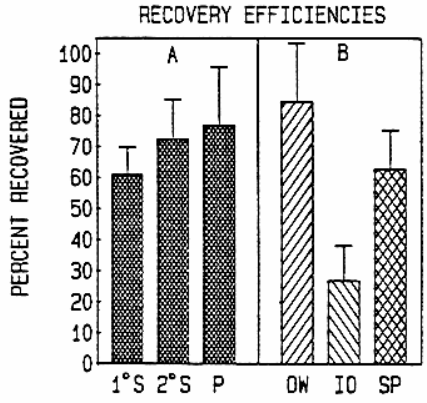


شکل ۵: درصد اووسیست های جدا شده از مراحل اول (1^oS) و دوم (2^oS) روش گرادیانت منقطع ساکارز و گرادیانت پرکول(P). (OO) : اووسیست های اصلی که در نمونه مدفوع صاف شده موجود می باشد.

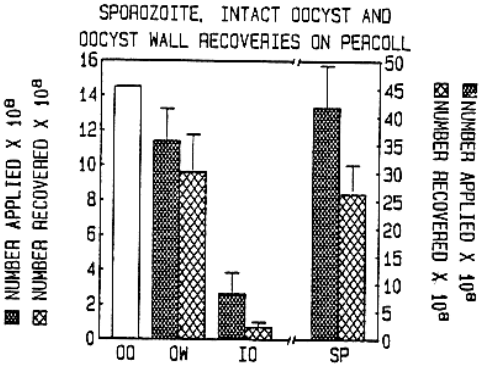
شکل ۷، تعداد اسپروزوئیت، اووسیست سالم و دیواره اووسیست را که در مرحله گرادیانت پرکول جدا شده اند نشان می دهد. میزان بازدهی و مفید بودن روشهای گرادیانت پرکول

www.SID.ir

و گرادیانت منقطع ساکارز که در جداسازی هر یک از موارد بالا به کار برده شده اند نیز در شکل ۶ نشان داده شده است.



شکل ٦: A. بازدهی مراحل اول (1°S) و دوم (2°S) روش گرادیانت منقطع ساکارز و گرادیانت پرکول (P) در جداسازی اووسیست های کریپتوسپوریدیوم. B. بازدهی روش گرادیانت پرکول در جداسازی اووسیست های سالم (IO)، دیواره اووسیستها (OW) و اسپروزوئیت ها (SP).



شکل۷: تعداد اووسیست سالم (IO)، دیواره اووسیست (OW) و اسپروزوئیت (SP) جدا شده به کمک گرادیانت پرکول. (OO) تعداد اووسیست اصلی تهیه شده برای عمل excystation است.

اسپروزوئیت هایی که در این بررسی به فرم خالص تهیه شدند فاقد دیواره اووسیست بوده و فقط ۲/۲٪ از آنها با اووسیست سالم آلوده بودند ($۷/۱۳\times ۱۰^{۷} \pm ۳/۰۰\times ۱۰^{۷}$) . بعد از انجام روش گرادیانت پرکول دیواره اووسیست ها (۸۵ درصد) در بالای لوله و اسپروزوئیت های سالم (۶۳ درصد) در ته لوله و چسبیده به لایه اووسیست های سالم (۲۷ درصد) قرار گرفتند. تعداد کمی از اووسیست ها نیز تخریب شده و یا نسبت به ماده استخراج مقاومت نشان دادند که اینها در فاصله بین لایه های دیواره اووسیست ها و اسپروزوئیت ها جای گرفتند.

بحث

بعد از صاف کردن نمونه های مدفوع با استفاده از فیلترهای مخصوص، می توان نمونه را در دی کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد و ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ماه نگهداری نمود، بدون اینکه اثری بر روی توانایی زنده ماندن یا خاصیت عفونت زایی اووسیست ها در موش یا گوساله ها ایجاد شود.

Jakson با استفاده از روش فلوتاسیون با محلول شیتر توانسته است اووسیست های Eimeria arloingi را از مدفوع بره ها جداسازی نماید (۱۲). در بررسی آنها بین ۶۰/۲ درصد و ۹۸ درصد از اووسیست های جدا شده به مواد ناخالص و باکتری آلوده بوده اند. تجارب ما در این مطالعه نشان داد که خالص‌سازی اووسیست های کریپتوسپوریدیوم با استفاده از روش شناورسازی با محلول شیتر اغلب رضایت بخش نمی باشد. اگرچه اووسیست های جدا شده با این تکنیک به میزان زیادی جدا شدند اما این اووسیست ها همراه با باکتری ها و سایر ناخالصی‌های مدفوعی بوده و نیازمند یک مرحله خالص سازی اضافی بودند. روشها و تکنیکهایی که در این مطالعه از آنها استفاده شد دارای مزایای ویژه ای هستند که از آن جمله می توان به انجام آسان، جداسازی و تخلیص تعداد زیادی اووسیست و اسپروزوئیت انگل و ارزان قیمت بودن آنها اشاره نمود. اووسیست هایی که در پایان مرحله دوم روش گرادیانت منقطع ساکارز جدا می شوند (۴۴ درصد تعدادکل) برای انجام بعضی از آزمایشات مناسب و عاری از ناخالصی های مدفوعی می باشند. بیش از ۳۴ درصد کل اووسیست ها نیز به شکل خالص در مرحله گرادیانت پرکول جدا می شوند. اووسیست های جدا شده از این مرحله واقعاً عفونت زا و عاری از آلودگی های میکروبی هستند.

Heyman و همکارانش بیان می کنند که فنل به عنوان یک ماده فرعی ممکن است باعث تغییر در خاصیت آنتی ژنیکی دیواره اووسیست انگل شود (۹). در بررسی حاضر در اووسیست های جدا شده با تکنیک گرادیانت منقطع ساکارز که فنل جزئی از ترکیبات آن است و با استفاده از آنتی بادیهای منوکلونال، هیچگونه تغییری در خاصیت آنتی ژنیسیته دیواره اووسیست های انگل مشاهده نگردید. اووسیست های به دست آمده به عنوان منبع مهمی جهت تهیه دیواره اووسیست یا اسپروزوئیت در بسیاری از بررسی های بیوشیمیایی و مولکولی و نیز در مطالعات

Archive of SID
www.SID.ir

ایمنولوژیک که به بررسی پاسخهای ایمنی میزبان در برابر آنتی ژنهای انگل می پردازد، کاربرد دارند.

جداسازی و تخلیص اسپروزوئیت های کریپتوسپوریدیوم ارزش ویژه ای برای مطالعات آزمایشگاهی به خصوص مطالعاتی که در شرایط In vitro انجام می شوند خواهد داشت. نتایج یک بررسی نشان می دهد که چند ساعت پس از تلقیح اووسیست های Eimeria bovis به محیط کشت سلولی، انگل باعث مرگ سلولها می شود (۶). حذف ناخالصی ها و مواد زائد چسبیده به دیواره اووسیست های Eimeria adenoides باعث افزایش تعداد اسپروزوئیت ها در مراحل اولیه تکامل انگل می شود (۳).

این مطالعات نشان می دهند که دیواره اووسیست انگلهای کوکسیدیا و یا ترشحات حاصل از اووسیست این انگل ها حاوی توکسین و یا مواد سمی است که اثرات زیان آوری را بر روی محیط کشت سلولی اعمال می کنند. در مجموع این مطلب به این معنا است که تخلیص اسپروزوئیت های کریپتوسپوریدیوم از اهمیت ویژه ای برخوردار است، زیرا تلقیح اسپروزوئیت های آلوده با تعداد زیادی اووسیست می تواند منجر به اغتشاش و آشفتگی گردد، به خصوص زمانی که در حال بررسی زندگی انگل باشیم (در شرایط In vitro دیواره اووسیست ها به سلولهای فیبروبلاست می چسبند و در عفونت ایجاد شده غیر قابل تشخیص هستند).

گزارشاتی مبنی بر تخلیص اسپروزوئیت های Eimeria با استفاده از ستونهای حاوی لایه های شیشه ای (۱۷) و ستونهای حاوی لایه های نایلون (۱۵) در بعضی از مقالات دیده می شود، اما هیچ یک از این روشها برای جداسازی اسپروزوئیت های کریپتوسپوریدیوم استفاده نشده است. در مطالعه حاضر تکنیک گرادیانت پرکول اسپروزوئیت های کریپتوسپوریدیوم را جداسازی نموده و باعث تفکیک دیواره اووسیست ها و اووسیست های سالم از یکدیگر می شود. میزان اسپروزوئیت های جدا شده در این روش ۶۳ درصد یا بیشتر بوده که به طور تقریبی با ۲/۲ درصد اووسیست سالم آلوده بودند. درجه آلودگی اسپروزوئیت ها به میزان excystation اووسیست ها وابسته است. اسپروزوئیت های به دست آمده با این روش جهت انجام آزمایشات ELISA، آنالیز آنتی ژن توسط SDS-PAGE و وسترن بلات و نیز جهت تجزیه DNA در بررسی‌های مولکولی بسیار مناسب می باشند. همچنین این اسپروزوئیت ها عفونت زا بوده و جهت مطالعات کشت انگل در شرایط In vitro مفید می باشد.

References

1. Current W. L., Haynes T. B., 1984, Complete development of Cryptosporidium in cell culture, Science, 224:603-609.
2. Chalmers R. M., Elwin K., Reilly W. J., Irvine H., Thomas A. L., Hunter P. R., 2002, Cryptosporidium in farmed animals: the detection of a novel isolate in sheep, Intern. J. Parasitol., 32(1): 21-26.
3. Doran D. J., 1970, Effect of age and freezing on sporozoites in cell culture, J. Parasitol., 56: 27-29.
4. Entrala E., Molina J. M. M., Lombardo M. J. R., Moreno M. S., Lazcano C. M., 2000, Cryptosporidium parvum: oocysts purification using potasium bromide discontinuous gradient, Vet. Parasitol., 92(3): 223-226.
5. Fayer R., Leek R. G., 1984, The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature and time on in vitro excystation of Cryptosporidium, J. Parasitol., 31: 567-569.
6. Fayer R., Hammond D. M., 1967, Development of first – generation schizonts of Eimeria bovis in cultured bovine cells, J. Parasitol., 14: 764-772.
7. Guyot K., Follet – Dumoulin A., Leliever E., Sarfati C., Rabodonirino M., Nevez G., Calliez J. C., Camus D., Dei-Cas E., 2001, Moleculae characterization of Cryptosporidium isolates obtained from humans in France, J. Clin. Microbiol., 39: 3472-3480.
8. Higgins J. A., Fayer R., Trout J. M., Xiao L., Lal A. A., Kerby S., Jenkins M. C., 2001, Real-time PCR for the detection of Cryptosporidium parvum, J. Microbiol. Meth., 47(3): 323-337.
9. Heyman M. B., Shigekuni L. K., Ammann A. J., 1986, Separation Cryptosporidium oocysts from fecal debris by density gradiant centrifugation and glass bead columns, J. Clin. Microbiol., 23: 789-791.
10. Heine J., Moon H. W., Woodmansee D. B., 1984, Persistent cryptosporidium infection in congenitally athymic (nude) mice, Infect. Immun., 43: 856-859.
11. Hammond D. M., Chobotra B., Ernst J. V., 1968, Cytological observation on sporozoites of Eimeria bovis and Eimeria auburnensis and Eimeria species from the ord kangaroo, J. Parasitol., 54: 550-558.
12. Jackson A. R. B., 1964, The isolation of viable coccidial sporozoites, parasitology., 54: 87-93.
13. Morgan U. M., Constantine C. C., O'Donghue P., Meloni B. P., O'Brien P. A., Thompson R. C. A., 1995, Molecular characterization of Cryptosporidium isolates from humans and other animals using random amplified polymorphic DNA analysis, Am. J. Med. Hyg., 52(6): 559-564.
14. McGlad T. R., Robertsort I. D., 2003, Gastrointestinal parasite of demestic cats in perth western Australia, Vet. Parasitol., 17(4): 251-263.

Archive of SID

www.SID.ir

15. Thahun G., Stockdale P. H. G., 1982, Sensitivity and specifieity of the indirect fluorescent antibody test in the study of four murine coccidian, J. Parasitol, 29: 129-132.
16. Waldman E., Tzipori S., Forsyth J. R. L., 1986, Separation of cryptosporidium species oocysts from feces by using a percoll discontinous density gradient, J. Clin. Microbiol., 23: 199-200.
17. Wagenbach G. E., 1969, Purification of Eimeria tenella sporozoites with glass bead columns, J. Parasitol., 55: 833-838.

Archive of SID

www.SID.ir