Archive of SID

استفاده از محیط کشت RPMI 1640 جهت کشت *Giardia lamblia*

عبدالعلی مشفع * محمد موحدی پور ** سعادت پرهیزگار ***

چکیده

تک یاخته *Giardia lamblia* در ابتدای روده باریک انسان زندگی نموده و باعث اختلال،بیماری و سوء جذب، بخصوص در اطفال می‌گردد. این انگل از نظر شیوع یکی از فراوانترین عوامل انگلی بیماریزا در انسان بوده و از نظر پزشکی حائز اهمیت فراوان می‌باشد. لذا تحقیق و مطالعه در زمینهٔ این انگل مورد توجه است.

مطالعات بیولوژیک تک یاخته مستلزم دست‌یابی به تروفوزوئیت در شرایط آزمایشگاهی است. همچنین با گسترش تستهای سرولوژیک و نیاز به آنتی‌ژن انگل، تکثیر تروفوزوئیت در آزمایشگاه بیش از پیش احساس می‌شود.

در این تحقیق از محیط کشت RPMI 1640 جهت رشد و تکثیر ژیاردیا استفاده گردید. کیستها به روش سوکروز چهار لایه‌ای تخلیص و پس از تحریک در محیط اسیدی به لوله هایی حاوی محیط کشت منتقل و در انکوباتور ۳۷درجه سانتی گراد نگهداری شدند. نمونه‌ها پس از ۲۴ ساعت، به مدت یک هفته، هر روز از نظر وجود تروفوزوئیت بررسی گردیدند. از ۵۳ نمونهٔ کشت داده شده، در ۲۵ نمونه تروفوزوئیت ژیاردیا رؤیت گردید. تکثیر تک‌یاخته به مدت طولانی و مقدار فراوان صورت نگرفت و مدت زمان متوسط حیات تروفوزوئیت ۳۸/۶ ساعت محاسبه گردید.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که از محیط کشت RPMI 1640 می‌توان جهت تبدیل کیست ژیاردیا به تروفوزوئیت و همچنین نگهداری تروفوزوئیت در شرایط آزمایشگاهی استفاده نمود.

اما برای تکثیر و پاساژ آن لازم است مواد دیگری به محیط اضافه شود.

واژه‌های کلیدی: *Giardia lamblia*، RPMI 1640، Culture (کشت)

مقدمه

Giardia lamblia تک یاخته‌ای است تاژکدار که در رودهٔ باریک انسان به صورت انگلی زندگی می‌کند. در برخی از مبتلایان به خصوص اطفال باعث ناراحتی‌های گوارشی، سوءجذب و اسهال چرب می‌گردد. به دلیل بیماریزایی این انگل واهمیت آن در پزشکی، روشهای تشخیص و درمان آن

* مربی وعضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج،دانشکده پزشکی،گروه انگل شناسی

** پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج

*** مربی و عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، آموزشکده بهداشت،گروه بهداشت عمومی

www.SID.ir

Archive of SID

مورد توجه متخصصین علوم پزشکی می‌باشد. امروزه با پیشرفت علم ایمونولوژی و توجه خاص به تستهای سرولوژیک در تشخیص بیماریها، نیاز به آنتی ژن عوامل بیماریزا بیش از پیش احساس می‌شود. یکی از روشهای تهیهٔ آنتی ژن، کشت انگل در شرایط Invitro و جدا سازی انگل می‌باشد؛ همچنین برای مطالعات بیولوژیکی تک یاخته‌ها و بررسی‌های سلولی و مولکولی، نیاز به محیط‌کشتی مناسب می‌باشد. اولین بار در سال Mayer،۱۹۷۶ موفق به کشت *Giardia Iamblia* در شرایط آزمایشگاه گردید(۱). پس از آن محققین دیگر نیز اقدام به کشت تک یاخته نمودند و مشکلاتی را در زمینه رشد و تکثیر تک یاخته‌ها بیان کردند.اما هنوز محیط کشت مناسب و صد درصد مورد اطمینان معرفی نشده است. لذا لازم است تا پژوهشهایی در این زمینه صورت گیرد. با توجه به این موضوع، در این تحقیق محیط کشت RPMI 1640 جهت کشت ژیاردیا مورد استفاده و چگونگی رشد و تکثیر تک یاخته در این محیط مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به آسانی تهیه این محیط کشت نسبت به محیطهای کشت گذشته، در صورت موفقیت در کشت تک یاخته، گامی بزرگ در این امر برداشته می‌شود.

مواد و روشها

ابتدا نمونه‌های مدفوع که دارای کیست ژیاردیا بودند به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکدهٔ پزشکی منتقل می‌گردید، سپس مراحل زیر به ترتیب انجام می‌شد:

۱- جداسازی کیست: برای جدا سازی کیست از مدفوع‌های جمع آوری شده از روش سوکروز چهار لایه‌ای استفاده شد. ابتدا نمونه‌ها شستشو و از گاز چهار لایه‌ای عبور داده شد و سپس چهار نوع محلول سوکروز با مولاریته‌های ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۵ تهیه و کیستها از نمونه‌های فوق جدا گردیدند.

۲- مرحله خروج از کیست: برای این منظور از اسید کلریدریک ۲ نرمال استفاده شد. ۱ میلی لیتر از کیست تخلیص شده در مرحله قبل را با ۹ میلی لیتر اسید کلریدریک ۲ نرمال مخلوط کرده و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. این محلول را به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰ سانتریفوژ نموده و پس از خالی کردن محلول رویی برای جدا کردن اسید، رسوب حاصله را یک یا دو بار با آب مقطر به کمک سانتریفوژ شستشو داده و پس از خالی کردن محلول رویی از رسوب حاصله برای اضافه کردن به محیط کشت استفاده شد.

۳-تهیه محیط کشت: برای تهیه محیط کشت از مواد زیر استفاده گردید:

RPMI 1640, L-Glutamine محصول شرکت Cellgro که به صورت پودر موجود بود و با غلظت g/l ۱۰/۳ استفاده شد.

HEPES محصول شرکت Sigma و با غلظت ۲۰ میلی مولار در دسی لیتر استفاده شد.

L-Cysteine محصول شرکت Merck به صورت پودر و دارای ویال ۲۵ گرمی که با غلظت ۱۱/۴ میلی مول در دسی لیتر استفاده شد.

آلبومین ۱۰٪ محصول شرکت بهارافشان.

همچنین از استرپتومایسین و پنی‌سیلین به میزان ۱۰۰/۰۰۰ واحد برای جلوگیری از رشد باکتریها استفاده شد. محیط کشت آماده شده به درون لوله‌های درپیچ دار منتقل و کیستهای القاء شده به وسیله اسید به هر لوله اضافه و حجم هر لوله را با محیط کشت پر کرده، به طوری که کمترین مقدار اکسیژن موجود باشد. بهتر است جهت جلوگیری از چسبیدن تروفوزوئیت‌ها به سر لوله‌ها کاملاً پر نشوند، سپس محیط کشتها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و به فاصله‌های مختلف از نظر دیدن تروفوزوئیت

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی شدند. برای جدا شدن تروفوزوئیت از دیواره لوله‌ها، به مدت ۱۰ دقیقه لوله‌ها در ظرف حاوی آب و یخ قرار داده شدند و سپس به آنها تکانهای شدید وارد کرده و از آن نمونه تهیه و جهت دیدن تروفوزوئیت بررسی گردیدند.

یافته‌ها

در این پژوهش، جمعاً ۵۳ نمونه مدفوع از افراد مبتلا به *Giardia lamblia* تهیه و به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکدهٔ پزشکی انتقال داده شد. کیستهای ژیاردیا از ۵۳ نمونهٔ فوق جداسازی و تخلیص و سپس به محیط کشت RPMI 1640 منتقل گردید.

از ۵۳ نمونه کشت داده شده، در ۲۵ مورد تروفوزوئیت ژیاردیا و در بقیهٔ موارد کیست‌ها بدون تبدیل به تروفوزوئیت مشاهده گردید. بنابراین ۴۷/۱ درصد از موارد کشت از نظر وجود تروفوزوئیت مثبت و بقیه (۵۲/۹٪) منفی اعلام می‌گردد.

در ۲۵ مورد مثبت، تروفوزوئیت‌ها به تعداد کم یافت شدند. در واقع تکثیر تروفوزوئیتها صورت نگرفت و فقط خروج از کیست مشاهده شد. بدین معنی که در محیط کشت RPMI 1640 کیست Giardia تبدیل به تروفوزوئیت می‌گردد، اما در این محیط تروفوزوئیت‌های ژیاردیا تکثیر نمی‌یابند.

مدت زمان زنده بودن تروفوزوئیت در محیط کشت RPMI 1640 نیز یادداشت و محاسبه گردید. تمامی ۲۵ نمونهٔ مثبت، طی ۲۴ ساعت اول زنده و فعال بودند. اما طی ۴۸ ساعت فقط ۱۰ مورد از نمونه‌ها زنده و زیر میکروسکوپ حرکت آنها رؤیت گردید. پس از ۷۲ ساعت فقط ۴ مورد از محیط کشتهای مثبت دارای تروفوزوئیت بودند و تنها یک مورد تا ۹۶ ساعت و همان یک مورد تا ۱۲۰ ساعت یعنی ۵ روز بعد از کشت دارای تروفوزوئیت زنده و فعال بود. پس از محاسبات انجام شده حیات تروفوزوئیتها در این محیط به طور متوسط ۳۸/۶ ساعت محاسبه گردید. بنابراین تروفوزوئیت‌های ژیاردیا را در محیط کشت RPMI 1640 می‌توان به مدت یک تا دو روز زنده نگهداشت و سپس به محیط‌های دیگر انتقال داد.

بحث و نتیجه گیری

در مطالعهٔ حاضر از محیط RPMI 1640 که یک محیط کشت سلولی است جهت رشد و تکثیر *Giardia lamblia* استفاده شده است. با توجه به محدود بودن مدت زمان اجرای طرح و همچنین مقدار مواد مصرفی موجود، تعداد ۵۳ نمونه کشت و بررسی گردید. نهایتاً پس از انجام آزمایشات لازم در حدود نیمی از کشتهای آزمایش شده از نظر وجود تروفوزوئیت مثبت و بقیه منفی بودند. تبدیل شدن کیست به تروفوزوئیت در این محیط کشت از موفقیتهای انجام این مطالعه می‌باشد. قبل از این اکثر محققین از محیط کشت‌های دیگر نظیر T.Y.I-S-33 جهت کشت این تک یاخته استفاده نموده‌اند. محیط کشت ذکر شده ترکیبی از مواد گوناگون است که بایستی با نسبتهای خاص تهیه و مراحل مختلف آماده سازی را پشت سر بگذارد. در این محیط مقادیر زیادی قارچ و باکتری نیز رشد می‌نمایند که باعث عدم موفقیت در یافتن تروفوزوئیت‌های ژیاردیا است(۴،۳).

با توجه به این مطالب، استفاده از محیط کشت سلولی RPMI 1640 به دلیل آسان بودن تهیه و آماده سازی آن و داشتن ترکیبات مفید برای رشد ژیاردیا، می‌تواند گامی مؤثر در جهت تکثیر آزمایشگاهی این انگل محسوب شود.

در تحقیقی که توسط Rebecca و همکارانش در سال ۱۹۹۱ صورت گرفت (۲)، کیستهای ژیاردیا

www.SID.ir

Archive of SID

در این محیط کشت تبدیل به تروفوزوئیت شدند اما تکثیر قابل توجهی نداشته‌اند که برای ادامه کار، آنها را به محیط T.Y.I-S-33 منتقل نموده‌اند. در آن مطالعه، بررسی ایمونولوژیک تک یاخته، مورد نظر محقق بوده است و برای به دست آوردن تروفوزوئیت می‌بایست از محیط کشت استفاده کند. محقق فوق تأثیر میزان اکسیژن و غلظت‌های مختلف سیستئین را نیز در کشت ژیاردیا در این محیط کشت ارزیابی نموده است و اکنون ما در این تحقیق از یافته‌های مؤثر ایشان استفاده و غلظتی از سیستئین که بیشترین تحریک در کشت ژیاردیا را باعث شده است، به محیط اضافه نمودیم. در تحقیق حاضر نیز نتایج به دست آمده مشابه تحقیق ایشان است. یعنی تکثیر فراوان تک یاخته صورت نگرفت و تعداد کثیری از کیستهای انتقال یافته به محیط کشت تبدیل به تروفوزوئیت شده و به طور متوسط مدت ۳۸/۶ ساعت زنده و فعال بودند اما تکثیر ننموده و از بین رفتند.

در تحقیق دیگر که در سال ۱۹۹۱ توسط Takeuchi و Miyahira انجام شد، از کشت ژیاردیا و دیگر تک یاخته‌ها نظیر لیشمانیا در محیط RPMI صحبت شده ولی به جزئیات کار و نتایج دقیق‌تر اشاره‌ای نشده است، چرا که در آن تحقیق هدف محقق مسائل دیگری در رابطه با نقش ATP در رشد تک یاخته‌های انگلی می‌باشد که برای دسترسی به تروفوزوئیت از این محیط استفاده نموده است. بنابراین چگونگی تکثیر مورد نظر نبوده و بحث نگردیده است (۵).

همانطور که مشاهده می‌شود، از محیط کشت RPMI 1640 می‌توان برای کشت تک یاخته و حتی کرمها در شرایط In vitro استفاده نمود (۸،۷،۶،۵). از آنجا که تبدیل شدن کیست به تروفوزوئیت نشان دهندهٔ مساعد بودن شرایط محیط کشت برای فعالیت تک یاخته محسوب می‌شود و بنابراین نتایج مثبت ضعیف در تحقیقهای فوق و پژوهش حاضر همگی می‌تواند نقاط قوتی باشد برای تحقیقات دیگر و تغییرات لازم بر روی محیط کشت RPMI 1640 و مساعد نمودن آن برای تکثیر قابل توجه و بقای تروفوزوئیت به مدت طولانی در این محیط، و راه را برای مطالعات بیولوژیک و ایمونولوژیک تک یاخته در شرایط آزمایشگاه هموار و آسان نماید. یکی از مواد مورد نیاز برای تکثیر تک یاخته هیدراتهای کربن می‌باشد. با توجه به فرمولاسیون محیط‌کشت RPMI 1640، مقادیر هیدرات کربن موجود در این محیط ناچیز می‌باشد. به نظر می‌رسد کمبود این مواد در محیط فوق می‌تواند تکثیر تک یاخته را تحت‌الشعاع قرار دهد و لازم است تحقیقات دیگر به طور مقایسه‌ای بین مقادیر مختلف هیدراتهای کربن از جمله گلوکز و تکثیر ژیاردیا در این محیط صورت گیرد.

از مواد دیگر که برای تکثیر تروفوزوئیت بخصوص در دئودنوم لازم و ضروری است، مواد صفراوی می‌باشد که می‌توان در تحقیقات دیگری با اضافه نمودن مواد صفراوی (با استفاده از صفرای گاو) به بررسی تأثیر آن بر تکثیر تروفوزوئیت ژیاردیا پرداخت. یعنی به هر ترتیب با تغییرات مفید و غنی سازی محیط کشت RPMI 1640 در آینده‌ای نه چندان دور می‌توان آن را به عنوان محیطی مطمئن با آماده سازی آسان و ارزان برای تکثیر ژیاردیا و مطالعه تروفوزوئیت، به دست آوردن آنتی ژنهای لازم، بررسی‌های دارویی بر روی تروفوزوئیت و غیره به جامعه علمی انگل‌شناسی و جانورشناسی معرفی و ارائه نمود.

از موارد قابل توجه در این تحقیق، کار کردن در شرایط کاملاً استریل می‌باشد. به طوری که در هیچ یک از نمونه‌های کشت داده شده در این تحقیق قارچ

www.SID.ir

Archive of SID

و یا باکتری به طور قابل توجه رشد ننمودند. این نشان دهندهٔ انجام عملیات طرح به روش استاندارد و استریل می‌باشد. بنابراین انجام کشت در این شرایط می‌تواند از رشد میکروارگانیزم‌های مزاحم جلوگیری و به رشد تک یاخته مورد نظر کمک نماید. در چنین شرایطی، در صورت موفقیت در غنی سازی محیط RPMI 1640 می‌توان به مقادیر قابل توجهی تروفوزوئیت ژیاردیا دست‌یافت.

تخلیص کیست در پژوهش حاضر نیز با موفقیت کامل همراه بود. روش سوکروز چهار لایه‌ای یک روش حساس و دقیق در تخلیص کیست این تک یاخته می‌باشد که انجام آن مستلزم دقت و مهارت شخصی است. در این تحقیق تمامی نمونه‌های مورد استفاده به درستی با روش فوق تخلیص و مقادیر مورد نیاز کیست برای انتقال به محیط کشت حاصل گردید. بنابراین تأکید می‌شود که دیگر محققین نیز از این روش جهت جدا سازی کیست‌های ژیاردیا استفاده نمایند که البته رعایت کامل مراحل انجام، مورد نیاز است(۹).

در این تحقیق، برای تحریک خروج از کیست، از اسید کلریدریک ۲ نرمال استفاده شد که قدرت این اسید را برای تحریک تروفوزوئیت به منظور خروج از کیست پس از انتقال به محیط کشت تایید می‌کند. که بر مبنای مطالعات دیگران همچنان می‌توان از این اسید برای تحریک به خروج از کیست استفاده کرد(۱۰). بنابراین با انجام تحقیق فوق این پیشنهادات اعلام می‌گردد:

۱- محققین برای بدست آوردن مقادیر کم تروفوزوئیت می‌توانند از محیط کشت RPMI 1640 با فرمولاسیون موجود در این پژوهش استفاده نمایند که مستلزم انجام کار در شرایط کاملا استریل و استفاده از مواد و وسایل استریل و ضد عفونی شده می‌باشد.

۲- محققین می‌توانند برای نگهداری تروفوزوئیتهای موجود که احتمالاً از راههای دیگر (مثلاً توباژ دئودنوم) به دست آورده‌اند، قبل از انتقال به محیطهایی دیگر، از این محیط کشت استفاده کنند.

تشکر و تقدیر

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی می باشد که هزینه آن از طرف حوزه پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج پرداخت شده است، لذا بدین وسیله از مسئول محترم حوزه پژوهشی و کارکنان آن حوزه تشکر و قدردانی می گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1- Lakhonina GM, Teras I.Simplified methods for the isolation and preservation of axenic Giardia lamblia culture. Parasitology 1978; 12(5): 439-43.

2-Rebecca A, Bertand GS, Gaetan M. Modification of RPMI 1640 for use in vitro immunological studies of host-parasite interaction in giardiasis. J Microbiol 1991; 627-28.

3- Lazara R. Detection of speicific anti- giardia serum antibody by an immunofluorescence test in children with clinical giardiasis. Am J Trop Med Hyg 1989; 40(5):477-79.

4- Rezaian M. Axenic culture and cryopreservation of Giardia lamblia isolation in Iran. Med J Isla Rep Iran 1995; 8(4):255-8.

5-Miyahira Y, Takeuchi T. Application of ATP measurement to evaluation of the growth of parasitic protozoa in vitro with a special reference to Pneumocystis carini. Comp Biochem Physiol 1991; 100(4): 1031-4.

6- Sunaga F, Namikawa K, Kanno Y. Continous in vitro culture of erythrocytic stages of Babesia gibsani and virulence of the cultivated parasite .J Vet Med Sci 2002; 64(7): 571-5.

7- Schuster FL. Cultivation of plasmodium SPP. Clin Microbiol Rev 2002; 15(3): 355-64.

8- Smith HL, et al. Development of a serum free system for the in vitro cultivation of Brugia malayi infective stage larvae. Exp Parasitol 2000; 95(4): 253-64.

9- Sheffield HG, et al. Ultrastructure of the cyst of Giardia lamblia. Am J Trop Med Hyg 1979; 20(1): 23-30.

10- Bingham AK. Giardia excystation can be induced in vitro in acidic solution. Nature 1988; 277: 301-2.

www.SID.ir