جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۳، ویژه نامه ۱، زمستان ۹۲، صفحات ۳۹ تا ۴۲

Original Article

معرفی محیط Liver Infusion Tryptose (LIT) برای کشت و تشخیص بلاستوسیستیس

علی موسوی[۱]، علی حقیقی [۱]، محمد رستمی نژاد [۲]، احسان ناظم الحسینی مجرد[۲]، فریده نادری [۱]، آنیتا محمدی ها[۱]، راحله رفیعی سفید دشتی [۳]، مسعود آل بویه[۲]

[۱] گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۲] دانشجوی دکترای پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۳] گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

سابقه و هدف: *بر اساس تحقیقاتی که اخیرا در مورد بلاستوسیستیس انجام شده است، این انگل به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده مشکلات گوارشی مطرح شده است. این انگل دارای اشکال گوناگونی بوده و تشخیص آن زیر میکروسکوپ کار ساده‌ای نیست. به همین علت در تحقیقات گوناگونی میزان شیوع آن متفاوت گزارش شده است. انجام روش‌های کشت شانس تشخیص این انگل را افزایش می-دهد. در این مطالعه برای اولین بار کشت بلاستوسیستیس در محیط Liver Infusion Tryptose (LIT) توصیف شده است.*

روش بررسی: *از محیط LIT حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو در لوله‌های در پیچ دار برای کشت انگل استفاده شد. نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *تعداد ۴۲۰ نمونه مدفوع تازه توسط محیط LIT مورد آزمایش قرار گرفتند و ۱۰۰ مورد مثبت (۲۳/۸٪) بلاستوسیستیس یافت شد. در حالی که فقط ۶۴ مورد مثبت (۱۵/۲٪) توسط روش دید مستقیم مشاهده شد.*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه بیانگر حساسیت یکسان این محیط و سایر محیط‌های کشت مورد استفاده می‌باشد و محیط جدیدی را برای کشت بلاستوسیستیس معرفی می‌کند.*

واژگان کلیدی: *بلاستوسیستیس، محیط کشت، تشخیص.*

مقدمه

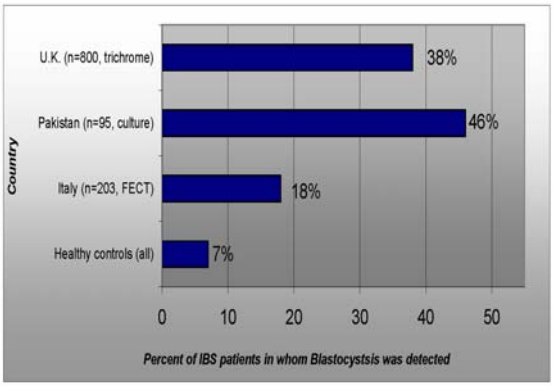
بلاستوسیستیس انگل روده‌ای تک سلولی است که در چند سال اخیر به علت ایجاد مشکلاتی در بعضی از بیماران مورد توجه مجامع علمی انگل شناسی قرار گرفته است. این انگل بی‌هوازی است و در روده بزرگ زندگی می کند. اندازه آن بین ۲ تا ۲۰۰ میکرون است (۱) و همچنین دارای اشکال مختلفی است که در زیر میکروسکوپ نوری و الکترونی قابل مشاهده می‌باشد (۲، ۳).

گزارش‌های زیادی نیز ارتباط بین این انگل و سندرم روده تحریک‌پذیر (IBS) را نشان می‌دهند. مطالعات گوناگونی در مورد زیر گونه‌های مختلف این انگل و احتمال ارتباط آنها با علائم گوارشی انجام شده است (۴). مطالعه‌ای که در پاکستان در سال ۲۰۱۰ انجام شده است (نمودار ۱) نشان می‌دهد که احتمالا یک زیرگونه از بلاستوسیستیس به نام ST1 عامل ابتلا افراد به IBS می‌باشد (۵). از آنجایی که فقط در ایالات متحده هزینه‌های مستقیم و غیرمستقیم درمان سالیانه افراد مبتلا به

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیماری های کبد و گوارش، احسان ناظم الحسینی (**email**: ehsanmojarad@gmail.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۷/۲۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۲۵

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

IBS حدود ۳۰ میلیارد دلار تخمین زده می‌شود اهمیت احتمالی ارتباط این انگل را با IBS بیشتر می‌کند (۶).



نمودار ۱. ارتباط بین وجود بلاستوسیستیس و ایجاد IBS در بیماران انگلستان، پاکستان و ایتالیا. با وجودی که IBS به ظاهر یک اختلال عملکردی می باشد، مشاهده شده است که ارتباط معنی‌داری بین وجود بلاستوسیستیس و ایجاد IBS در بیماران انگلستان، پاکستان و ایتالیا وجود دارد.

با توجه به مطالب عنوان شده تشخیص این انگل می‌تواند بسیار مهم باشد. کشت انگل روش خوب و مناسبی برای تشخیص موارد مشکوک و همچنین رشد و تکثیر انگل برای مطالعات تحقیقاتی مانند بررسی اثر عوامل و مواد شیمیایی و بیولوژیک مختلف و استخراج DNA است. کشت تک یاخته به دو صورت گزنیک و آگزنیک انجام می‌شود.

در محیط‌های گزنیک معمولا همراه تک یاخته مورد نظر یک یا چند نوع باکتری وجود دارد، ولی در محیط‌های آگزنیک با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مناسب میکروارگانیزم‌ها را از بین می‌برند و محیط برای رشد تک یاخته‌ها اختصاصی می‌شود. در محیط آگزنیک سرعت رشد انگل بسیار کم و زمان بیشتری برای کشت آن احتیاج است (۷). استفاده از محیط‌های کم هزینه از جمله محیط گزنیک LIT که بتواند به خوبی رشد انگل را تضمین نماید، در شناسایی انگل و مطالعات ملکولی ارزشمند است. هدف از این مطالعه معرفی یک محیط ساده و سریع جهت کشت انبوه بلاستوسیستیس بود. محیط LIT که در گذشته برای کشت انگل‌های هوازی مثل تریپانوزوم (۸) و لشمانیا (۹) استفاده شده است، برای اولین بار در این مطالعه جهت کشت یک انگل بی هوازی روده‌ای مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روشها

تعداد ۴۲۰ نمونه مدفوع از بیماران دارای علایم گوارشی جمع آوری شده و بعد از انتقال به آزمایشگاه در محیط LIT کشت داده شدند. برای این کار، به اندازه یک لوپ از نمونه مدفوع در کنار شعله وارد لوله حاوی محیط کشت گردید. اگر نمونه آبکی بود، می‌توان مقداری از نمونه را توسط سمپلر به محیط اضافه کرد. سپس محیط‌ها در ۳۷ درجه انکوبه و بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت رشد بلاستوسیس‌ها بررسی شد.

با توجه به جدول ۱ که در آن مواد و مقادیر مورد نیاز برای تهیه محیط LIT آورده شده است، ابتدا نمک‌ها در ۶۰ میلی لیتر آب مقطر حل شده و پس از اضافه کردن تریپتوز به آن در ۵۰ درجه سانتی‌گراد با کمک مگنت مخلوط گردید.

جدول ۱. مواد مورد نیاز جهت تهیه محیط LIT

مواد مورد نیاز	مقادیر مورد نیاز
NaCl	4 gr
KCl	0.4 gr
Na HPO4, 12 H2O	8 gr
Glucose	2 gr
Triptose (Difco)	5 gr
Liver infusion broth (Difco)	1 gr
Haemin	1 gr
Distilled water	900 ml

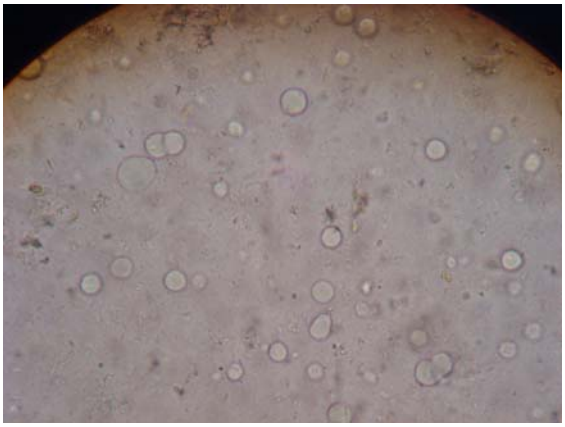
سپس بقیه مواد را به آرامی اضافه کرده تاکاملاً حل شوند. pH محیط با کمک HCl ۶ نرمال روی عدد ۷/۴ تنظیم گردد. در مرحله بعد ۲۵ میلی‌گرم پودر Haemin رادر یک میلی‌لیتر NaOH یک نرمال حل کرده و به مخلوط فوق اضافه شد. محیط در ظرف‌های ۹۰ میلی‌لیتری تقسیم و بعد از اتوکلاو در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در شرایط استریل به هر واحد ۹۰ میلی‌لیتری ۱۰ میلی‌لیتر سرم جنین گاو یا سرم اسب غیر فعال اضافه شده که در این شرایط در ۴ درجه سانتی‌گراد تا یک ماه قابل نگهداری است. این محیط را می‌توان بدون افزودن Haemin نیز تهیه کرد.

یافته‌ها

پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه محیط کشت در دمای ۳۷ درجه با کمک پیپت پاستور استریل یا سمپلر از رسوب ته محیط کشت یک قطره برداشته و پس از تهیه گسترش در زیر میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه از ۴۲۰ نمونه مدفوعی که کشت داده شدند تعداد ۱۰۰ مورد در محیط LIT تکثیر نمودند، در حالی که تعدا ۶۴ آنها (۱۵/۲٪) با روش مستقیم و ۷۰ مورد (۱۶/۷٪) با روش تغلیظ مشاهده شده بودند. شکل ۱ بلاستوسیستیس‌ها را در محیط LIT نشان می‌دهد.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

نتایج نشان دادند که انگل بعد از ۴۸ ساعت به تعداد کافی برای تشخیص تکثیر پیدا می‌کند، ولی اگر تعداد بیشتری انگل برای کارهای تحقیقاتی مثل استخراج DNA نیاز داشته باشیم بعد از ۷۲ ساعت نتیجه بسیار بهتری حاصل می‌گردد.



شکل ۱. شکل های مختلف بلاستوسیستیس. در این عکس که از محیط کشت LIT به طور مستقیم گرفته شده است، شکل‌های مختلف بلاستوسیستیس مشاهده می‌شود (بزرگ نمایی ۴۰۰).

بحث

با توجه به آمار موجود، بلاستوسیستیس یکی از شایع‌ترین انگل‌های موجود در جهان حتی در بین جوامع صنعتی است (۱). آمار متنوعی از این انگل وجود دارد که نشانگر پراکندگی غیریکنواخت آن در سراسر جهان است. از آنجایی که بلاستوسیستیس دارای تنوع بسیار زیادی از لحاظ اشکال میکروسکوپی می‌باشد، شناسایی شکل‌های مختلف آن توسط پرسنل آزمایشگاه کار مشکلی به نظر می‌رسد. در ایران مطالعات گوناگونی در نقاط مختلف کشور صورت گرفته است (۱۰، ۱۱). متاسفانه اکثر این مطالعات فقط به صورت میکروسکوپی و به روش دید مستقیم انجام گرفته است و به همین علت آمار متفاوت و متنوعی از شیوع آن گزارش شده است.

از همین رو شاید بتوان برای تشخیص بهتر از روش کشت که روشی ساده و با حساسیت بالا برای تکثیر و تشخیص انگل است استفاده نمود. در این مطالعه به غیر از کشت انگل در محیط LIT که برای اولین بار جهت کشت بلاستوسیستیس به کار برده شد، از محیط‌های دیگری نظیر Robinson، RPMI 1640 و DMEM نیز استفاده شد تا بتوان مقایسه‌ای بین آنها انجام داد.

پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه و انجام کشت روی هر ۴۲۰ نمونه در محیط های مذکور نتیجه یکسانی به دست آمد و تعداد ۱۰۰ نمونه حاوی بلاستوسیستیس (۲۴ ٪) در هر چهار محیط رشد نمودند. نتایج نشان می‌دهد هر چهار محیط کشت از نظر تکثیر انگل مشابه هم عمل کرده‌اند که این نتیجه نشان دهنده مناسب بودن این محیط کشت در تشخیص بلاستوسیستیس است. لازم به ذکر است که مورفولوژی انگل در محیط رابینسون نسبت به سایر محیط‌ها بسیار متنوع‌تر بود که می‌تواند به علت وجود منبع غذایی باکتریال برای انگل در این محیط باشد و از آن می‌توان برای مطالعات مورفولوژیک روی بلاستوسیستیس استفاده کرد. اما تهیه محیط LIT نسبت به رابینسون بسیار ساده‌تر و ارزان‌تر است که این مزیت ویژه این محیط کشت است. همچنین محیط‌های RPMI 1640 و DMEM در صورت عدم رعایت شرایط استریل و عدم انجام کار در زیر هود به راحتی می‌توانند آلوده شوند و در مدت زمان کوتاهی دچار تغییرات pH شوند و کارایی خود را از دست بدهند. با انجام این مطالعه به نظر می‌رسد استفاده از محیط LIT از این جهت یک مزیت باشد، چون به سادگی دو محیط دیگر آلوده نمی‌شود. ولی تهیه RPMI 1640 و DMEM به علت اینکه می‌توان آنها را به صورت آماده خریداری نمود راحت‌تر است. نتایج این مطالعه نشان داد که در بین محیط‌هایی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند، تهیه LIT هزینه کمتری دارد و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه می‌باشد. لذا با توجه مطالب فوق، علاوه بر تشخیص بلاستوسیستس، استفاده روتین از این محیط کشت در تشخیص دیگر انگل‌های روده‌ای توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

از ریاست و همکاران مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که ما را در انجام این طرح تحقیقاتی یاری دادند، تشکر و قدردانی می‌شود. این مقاله از پایان نامه کارشناسی ارشد علی موسوی منتج شده است.

REFERENCES

1. Stenzel DJ, Boreham PF. Blastocystis hominis revisited. Clin Microbiol Rev 1996; 9:563-84.
2. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of Blastocystis spp. Clin Microbiol Rev 2008; 21:639-65.

3. Menounos PG, Spanakos G, Tegos N, Vassalos CM, Papadopoulou C, Vakalis NC. Direct detection of Blastocystis sp. in human faecal samples and subtype assignment using single strand conformational polymorphism and sequencing. Mol Cell Probes 2008; 22:24-29.

4. Moosavi A, Haghighi A, Mojarad EN, Zayeri F, Alebouyeh M, Khazan H, Kazemi B, et al. Genetic variability of Blastocystis sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Iran. Parasitol Res 2012; 111:2311-15.

5. Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, et al. Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of Blastocystis hominis. Parasitol Res 2010; 106:1033-38.

6. Boorom KF, Smith H, Nimri L, Viscogliosi E, Spanakos G, Parkar U, et al .Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, Blastocystis, and asymptomatic infection. Parasit Vectors 2008; 1:40.

7. Chen X, Singh M, Ho L, Tan S, Ng G, Moe K, et al. Description of a Blastocystis species from Rattus norvegicus. Parasitol Res 1997;83:313-18.

8. Stecconi-Silva R, Andreoli WK, Mortara R. Parameters affecting cellular invasion and escape from the parasitophorous vacuole by different infective forms of Trypanosoma cruzi. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98:953-58.

9. Giannini MS, D'Alesandro PA, Garcia CR, Saraiva EM. Failure of hamster macrophages to discriminate between infective and noninfective promastigotes of Leishmania donovani during attachment in vitro. Infect Immun 1981; 34:629-32.

10. Haghighi A ,Khorashad AS, Mojarad EN, Kazemi B, Nejad MR, Rasti S. Frequency of enteric protozoan parasites among patients with gastrointestinal complaints in medical centers of Zahedan, Iran. Trans R Soc Trop Med Hyg 2009; 103:452-54.

11. Arani AS, Alaghehbandan R, Akhlaghi L, Shahi M, Lari AR. Prevalence of intestinal parasites in a population in south of Tehran, Iran. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2008; 50:145-49.