مقایسه روش های تغلیظ و خالص سازی کیست ژیاردیا

افشین برازش[1]، جعفر مجیدی[2]، اسماعیل فلاح[3]، رسول جمالی[4]، اردوان قازانچائی[1]
1- کارشناس ارشد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، گروه انگل شناسی
2- دانشیار، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، گروه ایمونولوژی
3- استادیار، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، گروه انگل شناسی
4- دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، گروه انگل شناسی

یافته / دوره هشتم / شماره 3 / پاییز 85 / مسلسل 29

چکیده

دریافت مقاله:85/1/23، ***پذیرش مقاله***: 85/5/6

Ø مقدمه: ژیاردیا لامبلیا از شایع ترین تک یاخته های روده ای انسان در سراسر جهان می باشد. تشخیص آن عمدتاً از طریق مشاهده مستقیم صورت می گیرد ولی روش های مبتنی بر IFA و ELISA نیز کاربردهای تحقیقاتی و سرواپیدمیولوژی دارد. برای تهیه آنتی بادی های پلی کلونال به هدف طراحی کیت های ELISA و IFA، مطالعات مولکولی و ژنومی، آزمایشاتی نظیر PCR و کشت انگل و سایر تحقیقات اپیدمیولوژی،نیاز به خالص سازی کیست های انگلی می باشد. روش های مختلفی برای این منظور منتشر شده است و در این بین روشی که بتواند کیست ها را در طی روند خالص سازی بطور سالم و زنده نگه داشته و نیز تقریباً عاری از سایر آلودگی های مدفوعی و مواد اضافه باشد، نیاز می باشد. لذا در این مطالعه ما بر آن شدیم که نمونه های مثبت را با چندین روش متداول خالص سازی کرده و از نظر درجه خلوص با همدیگر مقایسه کنیم.

Ø مواد و روش ها: نمونه های مثبت طی سه روش جداگانه گرادیان یک مرحله ای سوکروز، گرادیان سوکروز-پرکول و گرادیان دو مرحله ای سوکروز در دو مرحله، مورد خالص سازی قرار گرفت. در نهایت نتایج حاصل از هر سه روش فوق از نظر درجه خلوص کیستی و میزان حذف مواد اضافی مدفوع و نیز میزان کیست های باز یافتی با لام مستقیم ولام نئوبار مورد بررسی قرار گرفت.

Ø یافته ها: محلول کیستی حاصل از روش اول و همچنین دوم حاوی کمی مواد دبری و سلولزی بود، در صورتی که در روش سوم، باکتری ها تقریبا حذف شده و کیست ها سالم بدست آمدند ولی میزان باز یافت آن کمتر بود(از 2گرم مدفوع حدود 3×10^4).

Ø نتیجه گیری: روش سوم (گرادیان دو مرحله ای سوکروز) در خالص سازی و ایزولاسیون کیست های انگل نسبت به دو روش قبلی مناسب تر بوده و میزان مواد اضافی مدفوع کاهش پیدا می کند ولی با اینحال ابداع روشی ساده که بتواند مواد اضافی و زاید را تا حد زیادی حذف نموده و از طرفی میزان بازیافتی کیست ها را بالا ببرد، ضروری به نظر می رسد.

واژه های کلیدی: ژیاردیا، کیست، خالص سازی

آدرس مکاتبه: تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی و انگل شناسی
پست الکترونیک: afshinbarazesh@yahoo.com

مقدمه

ژیاردیا لامبلیا (دئودنالیس) یکی از پاتوژن های تک یاخته ای مهم است که در طبقه بندی جزو تاژک داران روده ای قرار می گیرد (1). این انگل انتشار جهانی داشته و شیوع آن حدود 200 میلیون نفر در دنیا تخمین زده می شود (2). در مرور 300 بررسی انجام گرفته در زمینه انگل های روده ای انسان درایران در نیم قرن گذشته، ژیاردیا در کنار آنتامبا هیستولیتیکا، شایع ترین تک یاخته های بیماریزا بوده اند (3). مهمترین راه انتقال آن توسط آب آلوده بوده ولی انتقال فرد به فرد و انتقال از راه غذا نیز اهمیت دارد (5-4). مهمترین علایم بیماری به ترتیب شیوع شامل:اسهال، سستی، نفخ شکم،دفع مدفوع چرب و بدبو، کرامپ های شکمی، تهوع، بی اشتهایی، کاهش وزن، استفراغ، تب، کهیر و یبوست می باشد (6، 7). گرچه بیماری خوش خیم است، در بعضی افراد بویژه بچه ها و خانم های باردار ممکن است بیماری شدید با کاهش مایعات بدن و نیاز به بستری شدن ایجاد کند (6، 8). اسهال مزمن ناشی از ژیاردیا خودبخود یا با درمان بهبود می یابد ولی بویژه در بچه ها با کاهش وزن، علایم شبیه اسپرو، استئاتوره و سوء جذب ویتامین B_{12}، ویتامین A، پروتئین دی گزیلوز و آهن همراه است (10-9). گاهی عدم تحمل لاکتوز وجود دارد. نظرات در مورد تأثیر ژیاردیازیس مزمن در رشد کودکان هنوز مورد بحث است (8). روش تشخیص معمول ژیاردیازیس، آزمون میکروسکوپی مستقیم مدفوع برای یافتن انگل می باشد (12-11). حساسیت این روش حتی با آزمایش چند نوبته مدفوع فقط 70-50% می باشد (13-12). در بیماران با ژیاردیازیس مزمن، حساسیت این روش ممکن است پایین تر هم باشد، زیرا کیست ها بطور متناوب دفع شده و تعداد آنها در سطح پایینی می باشد. آزمایش آسپیراسیون مایع دئودنوم و یا ژژنوم و بیوپسی از روده باریک ممکن است دارای حساسیت بیشتری باشند (14) ولی پرهزینه بوده و روش های تهاجمی می باشند و بخاطر همین بندرت استفاده می شوند. لذا تشخیص سرولوژیکی با روش هایی نظیرIFA و یا ELISA می تواند با درصد بالایی از حساسیت صورت گیرد (16-15). در امور تحقیقاتی در جهت طراحی کیت های ELISA و IFA، برای دستیابی به آنتی بادی های پلی کلونال تقریباً یکدست و خالص بر علیه انگل، قدم اول خالص سازی کیست های انگل و تهیه مقادیر زیادی از انگل بدون تغییراتی در آن و عاری از هر گونه مواد اضافی مدفوع می باشد که بتوان بعنوان آنتی ژن و ایمن سازی حیوان مورد استفاده قرار داد. علاوه بر این در کشت انگل بمنظور دستیابی به مقادیر فراوان فرم تروفوزوئیت انگل، دسترسی به فراکسیون غنی از کیست های انگلی ضروری می باشد. این فراکسیون های غنی از کیست، علاوه بر موارد فوق، در مطالعات مولکولی و بررسی های ژنومی که نیاز به وجود DNA نسبتاً خالص و یکدست دارد، در تهیه لام های آموزشی و در ایمیونیزاسیون از راه دهانی حیوان برای تحقیقات درمان با دارو یا مقاومت داروئی و همچنین در مطالعات اپیدمیولوژیکی نیز کاربرد دارد. بنابراین نیاز به یک روش سریع، ارزان و آسان که بتواند کیست های انگلی را در طی روند خالص سازی بطور سالم و زنده نگه داشته و نیز تقریباً عاری از سایر آلودگی های مدفوعی و مواد اضافه باشد، احساس می شود. لذا در این مطالعه ما بر آن شدیم که نمونه های مثبت را با چندین روش متداول خالص سازی کرده و از نظر درجه خلوص با همدیگر مقایسه کنیم.

مواد و روش ها

بعد از انتخاب مدفوع آلوده (در هر میدان میکروسکوپی 40، بیشتر از 8 عدد و بدون آلودگی به مخمّر یا سایر انگل های روده ای)، آن را در 5 برابر حجم خود با آب مقطر حل و سوسپانسیونی یکنواخت و همگن تهیه شد. پس از عبور دادن سوسپانسیون از 3 لایه تنزیب، مایع در لوله های آزمایش مدرج مخروطی ریخته شده و جهت شستشو در دور 500g به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد مایع رویی بیرون ریخته

شده و با سه روش زیر، عمل خالص سازی روی این رسوب انجام گرفت.

الف - گرادیان سوکروز1مرحله ای:

رسوب در آب مقطر حاوی توین 80 نیم درصد حل شده و در دورg 700 بمدت 5 دقیقه سانتریفیوژ گردید و تا تمیز شدن مایع رویی آن، این کار ادامه یافت. سپس رسوب با آب مقطر بحالت سوسپانسیونی با غلظت مناسب در آمده و روی محلول سوکروز با گراویتی 0/85 مولار با نسبت مساوی در لوله های آزمایش معمولی به آرامی اضافه شد، طوری که دو فاز کاملاً متمایز تشکیل داده باشد. سپس لوله ها در دور g 500 بمدت 20 دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت ذرات اضافی و درشت مدفوع در ته لوله رسوب نموده و فاز بینابینی (لایه میانی تشکیل یافته در بین فاز آبی و محلول سوکروز) به دقت و به آرامی با پی پت پاستور جمع آوری گردید و به لوله دیگری منتقل شد. سپس جهت حذف سوکروز آن،در دور g 500 بمدت 5 دقیقه برای 3-2 بار با آب مقطر سانتریفیوژ شد. در انتها رسوب حاصله در کمی آب مقطر بحالت سوسپانسیون درآمد.

ب - گرادیان سوکروز2مرحله ای:

رسوب در بافر PBS 0/2 مولار حل گردیده و کاملاً مخلوط شد و در دور g 500 بمدت 5 دقیقه سانتریفیوژ گردید و این عمل شستشو تا زمانی که مایع رویی آن تمیز شود،ادامه پیدا کرد. رسوب در 5 سی سی آب مقطر حل شده و روی سوکروز با گراویتی 1/5 مولار به همان نسبت، اضافه گردید. بعد در دور 1700g برای 10 دقیقه سانتریفیوژ شد و نتیجه کار، بدست آمدن یک فاز بینابینی و رسوب ته لوله بود. رسوب حاوی قطعات بزرگ سلولز و مواد مدفوعی بوده و فاز میانی هم شامل کیست ها و همچنین مقداری مواد دبری و زاید بود. در مرحله دوم خالص سازی، فاز میانی جمع آوری شده و با آب مقطر در دور 300g بمدت 5 دقیقه در 4 درجه سانتریفیوژ شد تا سوکروز آن حذف شود. رسوب حاصله در 5 سی سی آب مقطر حل شده و این بار روی محلول سوکروز با گراویتی 0/75 مولار اضافه شد و در دور 1700g بمدت 10 دقیقه سانتریفیوژ گردید. در این مرحله کیست ها در ته لوله رسوب نموده و قطعات سلولز در فاز میانی جمع آوری گردیدند.

ج - گرادیان سوکروز-پرکول:

رسوب با آب مقطر بحالت سوسپانسیونی در آمده و در دور 500g بمدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شد و تا زمانی که مایع رویی آن تمیز شود، عمل شستشو ادامه یافت. سپس رسوب در کمی آب مقطر بحالت سوسپانسیون در آمده و روی محلول سوکروز با گراویتی 1مولار اضافه گردید و در دور 500 بمدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز میانی جمع آوری و برای 3-2 بار با آب مقطر شستشو داده شد و در مرحله بعدی روی 2 لایه از پرکول با گراویته های 1/05 و1/09 اضافه گردید. بعد لوله ها در دور 500g بمدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شده و فاز تشکیل یافته در بین 2 لایه پرکول جمع آوری گردید و 3-2 بار شستشو و در آخر با کمی آب مقطر بحالت سوسپانسیون درآمد.

یافته ها

نتیجه عمل هر کدام از روش های مورد استفاده، بررسی شده و با همدیگر مقایسه گردید. جهت تعیین درجه خلوص کیست های مورد نظر و میزان حذف مواد اضافی مدفوع، از سوسپانسیون های نهایی بدست آمده، لام مستقیم تهیه و به روش میکروسکوپی مطالعه شد. جهت تعیین میزان کیست های باز یافتی، از لام نئوبار استفاده گردید، هر چند که تعداد کیست های حاصله به میزان آلودگی نمونه مورد نظر هم وابسته می باشد. سوسپانسیون حاصله طی روش اول خالص سازی، حاوی مقادیری باکتری و نیز ذرات ریز سلولزی بود و به نظر می رسید که می توان از حدود 2 گرم مدفوع حدود $10^4 \times 5$-2 کیست استخراج نمود. در روش دوم، باکتریها تقریباً حذف شده و کیست ها سالم بدست آمدند ولی محلول کیستی کمی دارای دبری و ذرات سلولزی بوده و تقریبا از 2 گرم مدفوع حدود

10^4×10-5 کیست حاصل گردید. در روش سوم هم کیست ها به همین وضع باز یافت شدند ولی میزان ریکاوری آن هم کمتر بود (از 2 گرم حدود 10^4×3).

بحث و نتیجه گیری

ژیاردیا لامبلیا یک پاتوژن تک یاخته ای روده ای است که انتشار جهانی داشته و عامل بیماری ژیاردیازیس با علایم اسهال، سوء جذب و... می باشد. انتقال آن از طریق فرم کیستیک انگل و توسط آب آلوده، غذا و فرد به فرد می باشد. جهت کشت انگل و نیز مطالعات مولکولی و تشخیصی و سایر تحقیقات علمی و دارویی، نیاز به خالص سازی و بازیافت کیست های انگل از مدفوع، طوری که کیست ها در روند خالص سازی بطور زنده و سالم و بدون تغییر بمانند، می باشد. در روش های منتشر شده در ایزولاسیون کیست های تک یاخته ها از مواد شیمیائی نظیر فرمالین، یودین، اتر یا جیوه استفاده گردیده است که خصوصیات فیزیکی و بیولوژی کیست ها را تحت تأثیر قرار می دهد (17، 18) و روش های دیگری نظیر گرادیان سوکروز یا پرکول هم باعث بدست آمدن سوسپانسیونی از کیست های حاوی مواد زاید مدفوعی می شود (18، 19). در مطالعه ای به هدف جداسازی آنتی ژن اختصاصی GSA65، از روش گرادیان سوکروز یک مرحله ای استفاده شده بود (11) که ما در این تحقیق روش اول خود را طبق این روش به انجام رساندیم. موارد مشابه این روش نیز قبلاً توسط محققان در مطالعات دیگر بکار گرفته شده بود (20، 21). نتیجه کار در این روش چندان رضایت بخش نبود زیرا در نهایت امر، به همراه کیست ها مقداری هم ذرات ریز و دبری مدفوعی و باکتری باقی ماند. مقایسه این روش با روش دیگری که در سال 2002 انجام شده (22) و نیز مطالعه سال 1997 (18) با روش گرادیان سوکروز 2 مرحله ای، نشان می دهد که نتیجه کار در این روش قابل قبول تر از روش اول می باشد و روش کار در مطالعه دوم ما طبق این روش صورت پذیرفت و نتایجی که بدست آمد مشابه نتیجه مطالعه والدریج بود و با اینکه باکتریها تقریباً حذف شده بودند ولی باز کمی مواد سلولزه و دبری باقی بود. در مطالعه ای دیگر در سال 1988 از محلول سوکروز و پرکول در این راستا استفاده شده بود (23) که روال کار ما در روش سوم مطالعه، مشابه این روش بود و در پایان یک سوسپانسیونی از کیست های یکدست و تقریباً عاری از آلودگی و کمی حاوی دبری بدست آمد. در مطالعه ای دیگر در سال 2002 عمل خالص سازی کیست به جهت تولید آنتی بادی پلی کلونال (12)، مطابق این روش صورت گرفته بود. محلول پرکول که در این مطالعه بکار رفته، بسیار گران قیمت بوده و از آنجائیکه کاربرد زیادی ندارد، بسیار کمیاب می باشد. به همین دلیل در مراکز تحقیقاتی بطور روتین یافت نمیشود و نیز تغییراتی که در سلول ایجاد می کند به مراتب بیشتر بوده و لذا استفاده از این روش با توجه به دلایل ذکر شده پیشنهاد نمی شود. روش سوم (گرادیان دو مرحله ای سوکروز) در خالص سازی و جداسازی کیست های انگل نسبت به دو روش قبلی مناسب تر بوده و میزان مواد اضافی مدفوع کاهش پیدا می کند. با اینحال ابداع روشی ساده که بتواند مواد اضافی و زاید را تا حد زیادی حذف نموده و از طرفی میزان بازیافتی کیست ها را بالا ببرد، ضروری به نظر می رسد.

تقدیر و تشکر

تحقیق حاضر بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات کاربردی و دارویی تبریز می باشد و نویسندگان مراتب تقدیر و قدردانی را ازمساعدتهای مسئولین این مرکزاعلام می دارند.

References

1. De Souza W, Lanfredi-Rangel A, Campanati L. Contribution of microscopy to a better knowledge of the blology of Giardia lamblia. Microsc Microanal, 2004 Oct; 10 (5): 513-527
2. Heyworth MF. Giardia infections. In: pradise lj et al, editors. Enteric infections and immunity newyork: plenum press, 1996; 227-38

۳- کیا عشرت بیگم، هوشیار ح، موبدی ا. بررسی گزارشات انگلهای روده ای انسان در ایران در نیم قرن گذشته. خلاصه مقالات ارائه شده در دومین کنگره سراسری بیماریهای انگلی ایران، تهران، ۱۳۷۶، ص ۱۳۷

4. Botancourt WQ, Rose JB. Drinking water treatment processes for removal of Cryptosporidium and Giardia, Vet parasitol, 2004 Dec 9; 126 (1-2): 219-234
5. Kappus KD, Lundgren RG, Juranek DD, Roberts JM, Spencer HC. Intestinal parasitism in the United States: update on a continuing problem. Am J Trop Med Hyg s
6. Shaw RA, Stevens MB. The reactive arthritis of giardiasis. A case report. JAMA. 1987; 258: 2734-2735
7. Clyne CA, Eliopoulos GM. Fever and urticaria in acute giardiasis. Arch Intern Med. 1989; 149: 939-940
8. Fathing MJG, Mata L, Urrutia JJ, Kronmal RA. "Natural history of Giardia infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth." Am J Clin Nutr 1986; 43: 395-405
9. Ali SA, Hill DR. Giardia intestinalls. Curr opin infect dis. 2003 Oct; 16 (5): 453-460
10. Hjelt K, Paerregaard A, Krasilnikoff A. Giardiasis causing chronic diarrhea in sub-urban Copenhagen: Incidence, physical growth, clinical symptoms and small intestinal abnormality. Acta Pediatr 1992; 81: 881-886
11. Rosoff JD, Stibbs HH. Isolation and identification of Giardia lamblia specific stool antigen (GSA65) useful in coprodiagnosis of giardiasis. Journal of Clinical Microbiology. 1986; 23: 905-910
12. Duque-Beltran S, Nichols-Orejuela RS, Arevalo-Jamaica A, Guerrero-Lozano R, Montenegro S, James MA. Detection of Giardia duodenalis antigen in human fecal eluates by enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal antibodies. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Dec 2002, 97 (8): 1165-1168
13. Burke JA. Giardiasis in childhood. Am J Dis Child. 1975; 129: 1304-1310
14. Burke JA. Giardiasis in childhood. Am J Dis Child. 1975; 1304-1310
15. Srijan A, Wongstitwilairoong B, Pitarangsi C, Serichanatalergs O, Fukuda CD, Bodhidatta L, et al. Re-evaluation of commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for the detectin of Giardia lamblia and Cryptosporidium spp from stool specimens. Southest Asian J Trop Public Health. Sep 2005; 36(4): 26-29
16. Fedorko DP, Williams EC, Nelson NA, Calhoun LB, Yan SS. Performance of three enzyme immunoassays and two direct fluorescence assays for detection of Giardia lamblia in stool specimens preserved in ECOFIX. J Clin Microbiol. 2000; 38: 2781-2783
17. Blagg W, Schlogel EL, Mansour NS. A new concentration technique for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. Am J Trop Med Hyg. 1955 Jan; 4(1): 23-8

18. Walderich B, Mueller L, Bracha R, Knobloch J, and Burchard GD. A new method for isolation and differentiation of native Entamoeba histolytica and E. dispar cysts from fecal samples. Parasitol. Res. 1997; 83: 719-721
19. Jyothi R, Foerster B, Hamelmann C, Shetty NP. Improved method for the concentration and purification of faecal cysts of Entamoeba histolytica for use as antigen. J. Trop. Med. Hyg. 1993; 96: 249-250
20. Visvesvara GS, Dickerson JW, Healy GR. Variable infectivity of human-derived Giardia lamblia cysts for Mongolian gerbils (Meriones unguiculatus). J Clin Microbiol. 1988 May; 26(5): 837–841
21. Roberts-Thomson IC, Stevens DP, Mahmoud AA, Warren KS. Giardiasis in the mouse: an animal model. Gastroenterology. 1976 Jul; 71(1): 57-61
22. Graham Clark1* C, Louis S. Diamond2. Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. Clin Microbiol Rev. 2002 July; 15(3): 329–341
23. Stibbs HH, Samadpour M, Manning JF. Enzyme immunoassay for detection of Giardia lamblia cyst antigens in formalin-fixed and unfixed human stool. J Clin Microbiol. 1988 September; 26(9): 1665–1669