● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ پنجم، شمارهٔ ۲، ص ۶۴-۶۰، ۱۳۷۷

مقالهٔ پژوهشی

کشت و نگهداری آنتامباهیستولیتیکا در محیط کشت سرم اسب، رینگر و نشاسته برنج (HSr+s)

علی حقیقی[1] و دکتر مصطفی رضائیان[2]

خلاصه

اولین بار در سال ۱۹۲۶ محیط کشت HSre+s (Horse Serum, ringer, egg+starch rice) توسط Dobell و Laidlaw ساخته و استفاده شد. از آن سال تاکنون این محیط در کنار ده‌ها محیط مختلف دیگر که برای کشت آنتامبا هیستولیتیکا توأم با دیگر میکروارگانیزم‌های روده‌ای ساخته شده‌اند، در بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیصی و تحقیقی سراسر جهان کاربرد داشته است. در ایران نیز طی دو دهه گذشته از این محیط در واحد تک یاخته‌شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی استفاده شده است. این محیط توسط رضائیان و معتضدیان (۱۳۶۸) ساده‌تر شد و آلبومین تخم‌مرغ مورد استفاده برای قسمت مایع آن، بدون ایجاد هیچ‌گونه تغییری در تعداد آمیب‌های تکثیر یافته، حذف گردید. در این مطالعه نیز از محیط کشت HSr+s از آبان‌ماه ۱۳۷۵ جهت تشخیص، کشت آنتامبا هیستولیتیکا استفاده شد و میزان رشد آمیب در آن برای مدت دو ماه شمارش و به طور متوسط حدود صدهزار در هر میلی‌لیتر به دست آمد که رشد نسبتاً خوبی محسوب می‌شود. همچنین ۸۵٪ نمونه‌های مثبت حاوی کیست یا تروفوزوئیت آمیب در این محیط کشت رشد و تروفوزوئیت آنتامباهیستولیتیکا به تنهایی یا توأم با بعضی از دیگر تک‌یاخته‌های روده‌ای تکثیر یافتند.

واژه‌های کلیدی: آنتامباهیستولیتیکا، محیط کشت HSr+s، کشت توأم با میکروارگانیزم‌های دیگر (کشت گزنیک)

مقدمه

کشت آنتامباهیستولیتیکا اولین بار توسط Boeck و Drbohlav در سال ۱۹۲۴ انجام و در سال ۱۹۲۵ یعنی ۵۰ سال بعد از کشف آن (Losch, ۱۸۷۵) گزارش شد (۲). Boeck محیط کشت LES (محلول لاک، تخم‌مرغ و سرم) را برای کشت چند تاژکدار روده‌ای ساخته بود و لذا همه نمونه‌های مدفوع برای کشت به آزمایشگاه وی ارسال می‌شد. در آن سال وی دو لوله با مدفوع یک بیمار مبتلا به اسهال خونی کشت داد و چهار روز بعد در این محیط هیچ تاژکداری پیدا نکرد، اما تعداد زیادی آمیب که

۱ـ دانشجوی دکترای انگل‌شناسی ۲ـ استاد انگل‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران

به عنوان آنتامباهیستولیتیکا شناسایی شدند، مشاهده نمود. در سال ۱۹۲۶ Dobell و Laidlaw مطالعات خود را روی کشت آنتامبا هیستولیتیکا در محیطی دو قسمتی (دی فازیک) به نام HSre+s گزارش نمودند. این افراد به اهمیت نقش نشاسته برنج به عنوان یک منبع کربوهیدراتی برای رشد و تغذیه آمیب نیز پی‌بردند. وجود نشاسته برنج، باعث افزایش قابل ملاحظهٔ رشد آمیب شده و در آنکیسته شدن آن نیز موثر است. در حال حاضر نشاسته برنج یکی از مواد لازم برای همه محیط‌های کشت گزنیک آمیب (کشت آمیب همراه با دیگر میکروارگانیزم‌ها) به شمار می‌رود (۴،۵،۶،۷).

از سال ۱۹۲۶ تاکنون ده‌ها محیط کشت مختلف دیگر برای کشت گزنیک آمیب جهت اهداف تشخیصی، بیولوژیکی و ایمونولوژیکی ساخته شده است، اما محیط HSre+s هم‌چنان به عنوان یکی از محیط‌های ساده و موفق در بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیصی و تحقیقی سراسر جهان به کار می‌رود (۵). در ایران نیز از این محیط کشت در آزمایشگاه واحد تک‌یاخته‌شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی استفاده می‌شود. رضائیان و معتضدیان در مطالعات خود، این محیط را کمی تغییر داده و ساده‌تر نمودند. آنها تخم‌مرغ آن را بدون اینکه تغییری در نتیجه ایجاد شود، حذف و تحت عنوان HSr+s گزارش نمودند(۱). در این مطالعه نیز محیط HSr+s علاوه بر کاربرد تشخیصی آن برای نگهداری آمیب‌های جدا شده از بیماران، جهت مطالعات کشت خالص آمیب (آگزنیک) و تهیه آنتی‌ژن استفاده شد.

مواد و روش‌ها

محیط HSre+s مرکب از حروف اول موادی است که برای ساخت آن استفاده می‌شود(Horse Serum, ringer, egg+starch) این محیط دو قسمتی (دی‌فازیک) و شامل یک قسمت جامد و یک قسمت مایع می‌باشد که طبق قرارداد قسمت جامد آن را با حرف بزرگ و قسمت مایع را با حرف کوچک نمایش می‌دهند.

۱- قسمت جامد

مقدار ۵-۲ میلی‌لیتر سرم اسب (محصول انستیتورازی) غیرفعال شده در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت در لوله‌های محیط کشت در پیچدار یا در پنبه‌ای استریل توزیع گردد و سپس لوله‌ها را به نحوی بطور مایل در فور یا بن‌ماری قرار می‌دهیم که محیط داخل آن طولی حدود ۴ سانتی‌متر بسازد. سرم‌ها در دمای ۸۰ درجه‌سانتی‌گراد برای مدتی حدود ۷۰ دقیقه منعقد شده و به این ترتیب قسمت جامد به دست می‌آید. باید توجه داشت که حرارت بیش از حد و یا زمان طولانی باعث خراب شدن محیط‌ها خواهد شد.

۲- قسمت مایع شامل :

الف) محلول رینگر:

- نمک (NaCl)	۹ گرم
- کلرور پتاسیم (KCl)	۰/۲ گرم
- کلرور کلسیم ($CaCl_2$)	۰/۲ گرم
- بیکربنات سدیم ($NaHCO_3$)	۰/۲ گرم
- آب مقطر (D.W.)	۱۰۰۰ میلی‌لیتر

مواد فوق را در ارلن ریخته، pH آن را روی ۷/۴-۷/۲ تنظیم و با اتوکلاو استریل می‌کنیم.

ب) آلبومین تخم‌مرغ

برای هر لیتر رینگر ۴ عدد تخم‌مرغ تازه لازم است. ابتدا تخم‌مرغ‌ها را با آب مقطر استریل کاملاً شسته و در اتانول ۷۰٪ قرار می‌دهیم، سپس آنها را مشتعل می‌نماییم تا پوسته‌شان کاملاً استریل شود. پس از آن با کمک قیچی یا پنس استریل یک سوراخ کوچکی در اتاقک هوایی تخم‌مرغ ایجاد نموده و در شرایط کاملاً سترون تخم‌مرغ را روی ارلن مایر حاوی رینگر قرار می‌دهیم تا مایع آلبومین از تخم‌مرغ به رینگر اضافه شود. مخلوط به دست آمده کاملاً به هم زده می‌شود تا آماده مصرف گردد. اگر لازم باشد این محلول را می‌توان با روش فیلتراسیون، استریل نمود (۵). این قسمت از محیط در این مطالعه حذف و تنها از رینگر استفاده شد(۱).

ج) نشاسته برنج

نشاسته برنج را می‌توان به طور آماده از مرک (Art.11684) یا شرکت British Drug Houses Ltd. خریداری نمود یا طبق روش Griffin و McCarten (۱،۵) ساخت. برای هر میلی‌لیتر قسمت مایع مقدار ۳-۲ میلی‌گرم نشاسته برنج لازم است. پودر برنج هم برای این منظور قابل استفاده است ولی باید به اندازه دو برابر نشاسته برنج استفاده شود.

د) استرپتومایسین سولفات

به مقدار ۲۵۰ تا ۵۰۰ میکروگرم به ازاء هر میلی‌لیتر مایع اضافه می‌شود تا از رشد بیش از حد باکتری‌های همراه جلوگیری کند. این آنتی بیوتیک تا حدی از رشد و تکثیر بلاستوسیستیس

هومینیس نیز جلوگیری می‌کند (۳). اما در صورتی که نمونه مورد استفاده دارای بلاستوسیستیس هومینیس باشد، داروی اصلی موثر روی آن آکریفلاوین (Sigma, A. 8251) است. این دارو را نیز برای اولین بار Dobell و Laidlaw استفاده نمودند(۱).

۳- محیط کامل

به قسمت جامد هر لوله محیط کشت، در شرایط کاملا استریل، مقدار کافی مخلوط رینگر-آلبومین یا رینگر تنها اضافه می‌شود تا آن را کاملاً بپوشاند، سپس نشاسته برنج به آن افزوده می‌شود. برای اطمینان از استریل بودن، می‌توان قبل از مصرف، محیط‌ها را ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور نگهداری نمود. لوله‌های حاوی قسمت جامد تا دو ماه و محیط کامل تا یک هفته در ٤ درجه سانتی‌گراد، قابل نگهداری هستند.

روش کشت

ابتدا لوله محیط کشت از یخچال خارج و در دمای اتاق قرار داده می‌شود. اگر این محیط کامل نبود، به آن رینگر، سپس نشاسته برنج و استرپتومایسین افزوده می‌شود. می‌توان نشاسته برنج را به میزان یک لوپ کامل اضافه نمود. استرپتومایسین نیز به صورت محلول یا پودر به میزان یک تا دو میلی‌گرم به هر لوله اضافه می‌شود. سپس حدود ۳۰ تا ۵۰ میلی‌گرم از نمونه مدفوع (یک یا دو لوپ کامل) یا ۰/۵ میلی‌لیتر از مدفوع دیسانتری یا سوسپانسیون مدفوع در رینگر، در شرایط استریل به لوله کشت وارد و با ثبت مشخصات و تاریخ کشت در دمای ۰/۵ ± ۳۵/۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌گردد.

روش مشاهده و پاساژ (انتقال) محیط‌ها:

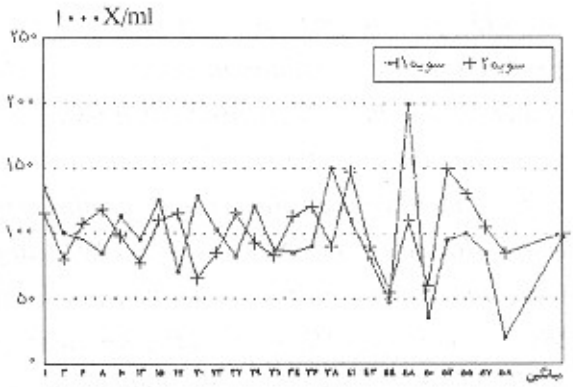
پس از ٤٨ ساعت انکوباسیون، با کمک پی‌پت پاستور استریل یک قطره از رسوب ته لوله محیط کشت را در کنار شعله برداشت نموده و بعد از گذاشتن روی لام در زیر میکروسکوپ به مطالعه آمیب‌های تکثیر یافته و متحرک می‌پردازیم. برای نگهداری آمیب‌های رشد یافته، مقدار حدود ۰/۵ تا ۱/۵ میلی‌لیتر (بسته به میزان تکثیر آمیب) از ته قسمت مایع با پی‌پت پاستور استریل کشیده و به محیط کامل تازه انتقال داده و هفته‌ای سه بار کشت می‌دهیم. می‌توان به محیط قبلی پس از تخلیه قسمت مایع، مجدداً رینگر، نشاسته برنج و استرپتومایسین اضافه و آن را نیز انکوبه نمود.

نتایج

این مطالعه از تاریخ ۱۳۷۵/۷/۵ با کشت اولین سویه آنتامبا (هیستولیتیکا/دیسپار) آغاز شد و در تاریخ ۱۳۷۵/۷/٦ دومین کشت انجام گرفت. از آن تاریخ علاوه بر نگهداری این دو سویه، ۷۲ نمونه مثبت و مشکوک نیز کشت داده شد که تنها تعداد ۲۰ مورد از آن‌ها از نظر آنتامبا (هیستولیتیکا/دیسپار) با روش‌های مستقیم، رنگ‌آمیزی تریکروم و کشت در محیط‌های مختلف، مثبت واقعی تشخیص داده شدند. در مجموع تعداد ۱۷ مورد (۸۵٪) از نمونه‌های آمیبی در محیط HSr+s تکثیر نمودند. هم‌چنین میزان رشد دو سویه آنتامبا در این محیط از تاریخ ۱۳۷۵/۱۱/۱ برای مدت دو ماه و هفته‌ای سه روز در ۲۵ نوبت با استفاده از لام نئوبار شمارش گردید (جدول ۱ و نمودار۱).

جدول ۱ : *میزان رشد دو سویه آنتامباهیستولیتیکا در محیط* HSr+s *در مدت دو ماه، سال ۱۳۷۵*

تناوب پاساژ (روز)	استرین ۱ /ml۱۰۰۰/تعداد	استرین ۲ /ml۱۰۰۰/تعداد
۱	۱۳۵	۱۱۵
۳	۱۰۰	۸۰
٦	۹۵	۱۰۷/۵
۸	۸۵	۱۱۷/۵
۱۰	۱۱۲/۵	۹۷/۵
۱۳	۹۵	۷۷/۵
۱۵	۱۲۵	۱۱۰
۱۷	۷۰	۱۱۵
۲۰	۱۲۷/۵	٦۵
۲۳	۱۰۲/۵	۸۵
۲۷	۸۲/۵	۱۱۵
۲۹	۱۲۰	۹۲/۵
۳۱	۸۷/۵	۸۲/۵
۳۴	۸۵	۱۱۲/۵
۳٦	۹۰	۱۲۰
۳۸	۱۵۰	۹۰
۴۱	۱۱۰	۱۴۷/۵
۴۳	۸۰	۹۰
۴۴	۴۷/۵	۵۵
۴۸	۲۰۰	۱۱۰
۵۰	۳۵	٦۰
۵۲	۹۵	۱۵۰
۵۵	۱۰۰	۱۳۰
۵۷	۸۵	۱۰۵
۵۸	۲۰	۸۵
میانگین	۹۷/۴	۱۰۰/٦



نمودار ۱ : میزان رشد دوسویه آنتامباهیستولیتیکا در محیط HSr+s به مدت دو ماه سال، ۷۵

در این محیط، آمیب‌ها از رشد خوبی برخوردار بودند و میانگین تکثیر برای سویه اول ۹۷۴۰۰ و برای سویه دوم ۱۰۰۶۰۰ آمیب در هر میلی‌لیتر محیط بود.

بحث و نتیجه‌گیری

محیط سرم منعقده یکی از ساده‌ترین و در عین حال مناسبترین محیط‌هایی است که انواع آمیب‌ها و تاژکداران روده‌ای (به جز ژیاردیا لامبلیا) در آن رشد می‌کنند. یعنی علاوه بر آنتامباهیستولیتیکا، آنتامبادیسپار، آنتامبا کلی، آنتامباهارتمانی، دی‌آنتامبا فراژیلیس، تریکوموناس هومینیس، تریکوموناس واژینالیس، کیلوماستیکس مسیلی و بلاستوسیستیس هومینیس نیز در آن تکثیر می‌یابند (۱،۵،۶)، ولی به جز برخی گونه‌های بلاستوسیستیس هومینیس، بقیه تک یاخته‌ها بعد از چند پاساژ کم‌کم از بین می‌روند و تنها آنتامباهیستولیتیکا و یا گونه غیرپاتوژن آن یعنی آنتامبادیسپار در ادامه پاساژها باقی می‌مانند. بلاستوسیستیس هومینیس، ارگانیزم مزاحمی است که در مواردی مانع تکثیر آنتامباهیستولیتیکا شده و یا از ادامه تکثیر آن جلوگیری می‌کند. در این مطالعه با وجود هر دو تک‌یاخته آنتامباهیستولیتیکا و بلاستوسیستیس هومینیس در محیط کشت در ۵۰٪ نمونه‌ها پس از چند پاساژ تنها آنتامباها باقی ماند (گرچه بهترین راه حذف بلاستوسیستیس هومینیس استفاده از آکریفلاوین است). انواع آمیب‌های تکثیر یافته در این محیط را با نوع حرکت، شکل و اندازه پای کاذب، اندازه تک یاخته و شکل هسته می‌توان متمایز نمود. محیط HSr+s جهت تفکیک انواع تک یاخته‌های روده‌ای، به عنوان یک روش تشخیصی آزمایشگاهی و نیز برای بررسی میزان آلودگی آمیبی در مناطق مختلف و مطالعات ایمنولوژیکی و بیولوژیکی قابل استفاده است. تک‌یاخته‌های تکثیر یافته در این محیط تا ۲۴ ساعت خارج از انکوباتور و در دمای ۲۵ تا ۳۵ درجه سانتیگراد زنده و فعال باقی می‌مانند و لذا به عنوان یک محیط برای جابه‌جایی گونه‌های آمیبی از منطقه‌ای به منطقه دیگر نیز مناسب است. طبق این مطالعه ۸۵٪ نمونه‌های مثبت در محیط HSr+s رشد نموده و کیست‌ها باز و آمیب‌ها تکثیر شدند. اعتبار (Validity) این روش با استفاده از آزمون‌های آماری تعیین حساسیت (Sensitivity) و ویژگی (Specificity) تعیین و حساسیت روش ۸۵٪ و ویژگی آن ۱۰۰٪ محاسبه گردید. هم‌چنین این روش دارای ارزش اخباری مثبت (Positive Predictive Value) ۱۰۰٪ و ارزش اخباری منفی (Negative Predictive Value) ۹۴/۵۴٪ می‌باشد. بنابراین، این محیط کشت از اعتبار قابل توجهی برای تشخیص آنتامباهیستولیتیکا برخوردار است. از ۱۷ کشت مثبت به جز یک مورد که فرم فعال آمیب از نمونه اسهال آبکی کشت داده شده بود، بقیه نمونه‌های مدفوع قوام‌دار و از حاملین کیست بودند. در صورتی که شرایط آزمایشگاه مناسب باشد، تا هر زمان که لازم باشد می‌توان آنتامباهای تکثیر یافته را در این محیط نگهداری نمود. میانگین رشد آمیب حدود ۱۰۰ هزار در هرمیلی‌لیتر است که رشد نسبتاً خوبی می‌باشد و بیشترین تکثیر در محیط‌های کشت آمیبی بین ۲۰۰ تا ۲۵۰ هزار در هر میلی‌لیتر گزارش می‌شود (۱،۵،۷). در این مطالعه میزان رشد آمیب‌ها در محیط کشت HSr+s با سه محیط دیگر یعنی : TYSGM(۸)، Liver Infusion Agar (۷) و رابینسون(۸) به طور همزمان در مدت دو ماه شمارش و مقایسه شد. پس از محیط کشت رابینسون که میانگین رشدی معادل ۲۲۸۰۰۰ در هر میلی‌لیتر برای دو سویه داشت و بیشترین تکثیر در محیط HSr+s حاصل گشت. در حالی که محیط HSr+s بسیار ساده‌تر از دیگر محیط‌های فوق می‌باشد و تهیه مواد آن در بیشتر آزمایشگاه‌های ایران امکان‌پذیر است.

Summary

The Cultivation of Entamoeba Histolytica in HSr+s Medium

A. Haghighi, PhD student and M. Rezaeian, PhD

1. PhD student of Parasitology, 2. Professor of Parasitology, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Teheran, Iran

In 1926 for the first time Dobell and Laidlow synthesized and used HSre+s (Horse serum, ringer, egg+starch rice) as a culture medium for growth of ***E.histolytica****. Since then this medium along with tens of other media have been used for growth of* ***E.histolytica*** *and other intestinal microorganisms. This medium has been used worldwide in many diagnostic and research laboratories. In Iran, in the past two decades they have used this medium in the School of Public Health and the Institute of Public Health research. Rezaeian and Motazedian (1989) simplified the original formula by not using the albumin of the egg and they found the same efficiency for the cultivation of* ***Amoeba*** *in HSr+s medium. Since Oct. 1996, we have used HSr+s medium for cultivation. and diagnosis of* ***Entamoeba*** *histolytica. Eighty five percent of stool cultures with* ***Entamoeba*** *(cyst or trophozoite) have been positive, furthermore* ***E.histolytica*** *were cultured in the medium, with the average growth rate of 100000/ml which indicates an efficient growth rate.*

Journal of Kerman University of Medical Sciences 1998; 5(2): 60-64
Key Words: ***Entamoeba histolytica,*** *HSr+s medium, Xenic cultivation*

منابع

۱. معتضدیان، محمدحسین: کشت آنتامباهیستولیتیکا در محیط‌های مختلف کشت و ارزشیابی آنتی‌ژن‌های تهیه شده به روشهای CIE, AGD, IFAT. پایان‌نامه برای دریافت درجه تخصصی در رشته انگل‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، ص ۱۳۶۷-۱۳۶۸، ۵۷، ۱۱۹، ۱۴۲.

2. Boeck WC and Drbohlav J. The cultivation of E. histolytica. *Am J Hyg* 1925; 5(4): 371-407.
3. Clifford LS and Morton HE. Further observation on the use of streptomycine and penicilin in the cultivation of E. histolytica from stools. *Am J Trop Med Hyg* 1952; 1(33): 412-416.
4. Dobell C and Laidlaw PP. On the cultivation of E. histolytica and some other extozoic amoeba. *Parasitology* 1926; 18(2): 283-318.
5. Diamond LS. Lumen dwelling protozoa: Entamoeba, Trichomonas and Giardia. In: Jensen JB (Ed). *In vitro* cultivation of protozoan parasites. (James B.Jensen) CRC Press, 1983; pp65-103.
6. Diamond LS. Entamoeba histolytica, Schaudinn 1903: From xenic to axenic cultivation. *J Protozool* 1986; 33(1): 1-5.
7. Diamond LS. Amoeba. In: Taylor AER and Baker JR(EdS). The cultivation of parasites *in vitro,* Oxford, Blackwall Scientific Publication, 1968; pp120-155.
8. Diamond LS. Entiamoeba, Giardia and Trichomonas. In Taylor AER and Baker JR(Eds). *In vitro* methods for parasite cultivation. London, Academic press, 1987; pp1-17.