پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال پانزدهم، شماره ۱، پی در پی ۷۳، صفحات ۳۱ تا ۳۷
فروردین و اردیبهشت ۱۳۸۹

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۴/۲۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۱۱/۱

بررسی تکثیر تک‌یاخته کریپتوسپوریدیوم در موشهای Balb/c و C57bl/6 با ایمنی سرکوب شده به منظور مدل‌سازی کریپتوسپوریدیوزیس در نقص ایمنی

دکتر حسین نهروانیان*[۱]، لیلا عابدین‌زاده [۲]، دکتر کرم ا...قاسمی[۳]، دکتر علی اسلامی‌فر[۴]، دکتر سهیلا اژدری[۵]، دکتر بهزاد اسفندیاری[۶]، دکتر صادق رهبری[۷]، مرضیه عزتی میرهاشمی[۶]

۱. دانشیار، گروه انگل‌شناسی، انستیتو پاستور ایران
۲. کارشناس‌ارشد زیست‌شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی
۳. استادیار، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی
۴. استادیار، بخش تحقیقات بالینی، انستیتو پاستور ایران
۵. استادیار، گروه ایمونولوژی، انستیتو پاستور ایران
۶. محقق، انستیتو پاستور ایران
۷. استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

چکیده

سابقه و هدف: کریپتوسپوریدیوم یک انگل کوکسیدیایی تک‌سلولی اجباری است که باعث بیماری کریپتوسپوریدیوزیس می‌شود. با توجه به وفور این بیماری در مبتلایان به نقص ایمنی و شیوع آن در مبتلایان به اسهال در ایران، اهمیت این انگل بیش از پیش آشکار می‌شود. بررسی این بیماری در مدلهای حیوانی با ایمنی سرکوب شده می‌تواند ما را در شناخت و کنترل آن یاری کند.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های مدفوع آلوده از انسان و دام جمع‌آوری شد. سپس ااسیست‌های آن جداسازی و با روش شناورسازی سوکروز تغلیظ شدند. موشهای Balb/c و C57bl/6 برای این مطالعه در نظر گرفته شدند. دگزامتازون بعنوان داروی سرکوب کننده ایمنی بصورت داخل صفاقی تزریق شد و پس از تایید سرکوب ایمنی با روش کشت لنفوسیتی، ااسیست‌های کریپتوسپوریدیوم بصورت خوراکی تلقیح شدند. پس از اثبات آلودگی، حیوانات را با روشهای انسانی کشته و اندامهای هدف (کبد، طحال، ریه و روده) جداسازی و پس از تهیه برش و رنگ‌آمیزی بافتی به روش هماتوکسیلین ائوزین جهت مطالعات هیستوپاتولوژیک مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: بررسی کشت لنفوسیتی موشها نشان داد ایمنی در موشهایC57bl/6 به میزان بیشتری نسبت به موشهای Balb/c سرکوب شده است، بطوری‌که ۸۰٪ موشهای C57bl/6 پس از سرکوب سیستم ایمنی و تلقیح انگل، آلوده شده و ۴۰٪ آنها پس از تلقیح انگل مردند. در حالی‌که فقط ۲۰٪ موشهای Balb/c آلوده شدند و همه آنها تا پایان آزمایش زنده ماندند. همچنین هیچگونه تغییرات هیستوپاتولوژیک در گسترشهای مربوط به اندامهای هدف در گروه آزمون نسبت به گروههای شاهد و سالم مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نخستین گزارش از آلودگی تجربی کریپتوسپوریدیوم، تکثیر انگل و شبیه‌سازی کریپتوسپوریدیوزیس در نقص ایمنی در مدل حیوانات آزمایشگاهی در ایران است. موشهای C57bl/6 نسبت به Balb/c درآلودگی به کریپتوسپوریدیوزیس حساسیت بیشتری نشان دادند.

واژگان کلیدی: کریپتوسپوریدیوم، دگزامتازون، لنفوسیت، Balb/c، C57bl/6، سرکوب ایمنی.

مقدمه

تک‌یاخته کریپتوسپوریدیوم ابتدا توسط کلارک در سال ۱۸۹۵ از سلول‌های اپی‌تلیالی معده موش جدا سازی شد (۱) و بیماری ایجاد شده کریپتوسپوریدیوزیس نامگذاری شد که از بیماریهای مهم انگلی بوده و گاستروانتریت حاد یا مزمن را بوجود می‌آورد (۲). اولین مورد کریپتوسپوریدیوزیس انسانی در سال ۱۹۷۶ در یک کودک سه ساله دچارگاستروانتریت شدید مشاهده شد (۳). چرخه کریپتوسپوریدیوم شامل دو مرحله جنسی و غیرجنسی است که با بلعیدن ااسیست‌ها

*نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر حسین نهروانیان؛ تهران، انستیتو پاستور ایران، گروه انگل شناسی، کد پستی ۱۳۱۶۴؛
پست الکترونیک: mobcghn@pasteur.ac.ir

شروع می‌شود. طی روند خروج از کیست، اسپوروزوئیت‌ها خارج شده و پس از حمله به سلول‌های اپی‌تلیالی، مرحله شیزوگونی آغاز شده که با تولید تروفوزوئیت‌ها، مروزوئیت‌ها و شیزونت‌ها همراه است. بعضی از مروزوئیت‌ها تمایز یافته و میکرو و ماکروگامت‌ها را ایجاد کرده و مرحله جنسی با لقاح آنها تکامل می‌یابد که با دفع ااسیست‌ها همراه است (۵،۴). عفونت کریپتوسپوریدیایی می‌تواند از طریق آب و غذا و یا از طریق تماس انسان با حیوان آلوده منتقل شود. امکان آلودگی در اثر تماس با انگل بسیار بالا بوده بطوری‌که بلعیدن تعداد معدودی ااسیست باعث ابتلا به این بیماری می‌شود (۶).

این انگل در حاشیه میکروویلی‌های اپی‌تلیوم روده ساکن شده و موجب بروز علائم بالینی می‌گردد که از یک اسهال حاد آبکی در افراد با ایمنی کامل (immunocompetent) که خود محدود شونده است شروع و تا گاستروانتریت شدید مزمن در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی (immunocompromised) که می‌تواند منجر به مرگ شود، متغیر است (۷). در افراد با ایمنی کامل، بیماری خود محدود شونده است، تا دو هفته طول می‌کشد و علائم آن شامل اسهال آبکی، تهوع و استفراغ، تب خفیف و دل‌پیچه است. اما در افراد با ایمنی ناقص علائم شدیدتری بروز می‌کند که شامل دل‌پیچه، ناتوانی، بی‌قراری، تب خفیف، بی‌اشتهایی، کاهش وزن و اسهال شبه وبایی است. گزارشات مختلف نشان می‌دهد که موارد کریپتوسپوریدیوز خارج گوارشی مربوط به افراد با سیستم ایمنی ضعیف است که از کریپتوسپوریدیوزیس مزمن رنج برده و انگل در نقاط غیرمعمول بدن دیده می‌شود (۶).

با اینکه مطالعات زیادی جهت درمان کریپتوسپوریدیوزیس در افراد مبتلا بخصوص بیماران با نقص ایمنی انجام شده است، درمان کامل و موثری جهت انتریت‌های کریپتوسپوریدیایی ارائه نشده است. در درمان افراد با ایمنی کامل، عوامل ضدمیکروبی زیادی از جمله نیتازوکسانید، پارومایسین و اسپیراسین مورد آزمایش قرار گرفته‌اند که تاثیرات درمانی نسبی در برابر بیماری داشته‌اند (۸). با توجه به تاثیر کم دارودرمانی در بیماران با ضعف ایمنی، ایمونوتراپی با بکارگیری ترکیبات مختلف چون کلستروم ایمن گاوی توصیه می‌شود که می‌تواند علائم بالینی را محدود کرده و اوضاع عمومی بیمار را بهبود بخشد (۹).

با توجه به شیوع کریپتوسپوریدیوزیس در مبتلایان به نقص ایمنی و مبتلا به اسهال، اهمیت مطالعه این انگل آشکار می‌شود (۱۰). هنوز اطلاعات کاملی در زمینه شناسایی انگل و آنتی‌ژن‌های محافظت‌کننده، مکانیزم ایمنی، درمان و واکسن در دسترس نیست (۱۱). به علت فقدان یک سیستم in vitro واقعی برای تکثیرکریپتوسپوریدیوم، مدل‌های حیوانی مناسب جهت کشت in vivo معرفی شده‌اند (۱۲). مطالعه این مدل‌ها برای دستیابی به کریپتوسپوریدیوزیس مزمن که بتوان انگل را تکثیر نمود ضروری است که از آن جمله می‌توان از خوکها، موشهای بالغ وحشی، موشهای فاقد تیموس و موشهای با جهش SCID (۱۳)، گوساله‌ها وبره‌های نوزاد (۱۲)، رت‌های Sprague-Dawley (۱۴)، موشهای نوزاد Balb/c (۱۵) و نژادهای C57BL/6، C3H/HeN، DBA/2N و CBA نام برد (۱۳). بررسیهایی که تاکنون در مورد کریپتوسپوریدیوم در ایران انجام شده‌اند اکثراً با رویکرد اپیدمیولوژیک بوده و توجه کمتری به مطالعات ایمونوپارازیتولوژیک شده است. لذا مشابه‌سازی بیماری در افراد با نقص‌ایمنی در میزبان حیوانی می‌تواند در شناخت بیشتر انگل و تعامل آن با میزبان کمک شایانی داشته باشد. بنابراین، هدف این پژوهش مدل‌سازی بیماری در حیوانات با نقص ایمنی، تلقیح انگلهای بومی به این حیوانات، تکثیر انگل و بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک در این حیوانات آزمایشگاهی و مقایسه تکثیر آنها در دو میزبان مختلف است.

مواد و روش‌ها

برای تهیه ااسیست کریپتوسپوریدیوم از نمونه‌های انسانی و حیوانی ۸۰ نمونه مدفوع از گوساله‌های مناطق مختلف شهرستان آمل و همچنین ۲۰ نمونه مدفوع از بخش کودکان بیمارستان امام رضا (ع) آمل جمع‌آوری شد. سپس این نمونه‌ها به آزمایشگاه انگل‌شناسی پژوهشکده شمال کشور منتقل گردید. همچنین تعدادی نمونه از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران نیز جهت تخلیص ااسیست تهیه گردید. پس از آزمایش مستقیم و استفاده از روش تغلیظ (concentration) بر روی قسمتی از نمونه، با روشهای مختلف تشخیص کریپتوسپوریدیوم مورد آزمایش قرار گرفت (۱۰).

برای تثبیت نمونه‌ها، تغلیظ و تهیه گسترش پس از ملاحظه وضعیت فیزیکی مدفوع حجمی به اندازه ۵ گرم از آن را برداشته و در بافر مخصوص فیکساسیون (فرمل-بافر-گلیسیرین) بصورت محلول درآورده تا آماده عمل تغلیظ شود (۱۶). پس از انکوباسیون در بافر فوق که برای غیر فعال شدن ارگانیزم‌های پاتوژن صورت گرفت، سوسپانسیون حاصله به وسیله Paraseb (Dis. Sys. Co.) مورد آزمایش قرار گرفت و به مدت دو دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی را دور ریخته و از رسوب حاصله جهت تهیه گسترشهای لازمه

استفاده کردیم. برای هر نمونه یک گسترش تهیه نموده و سپس در حرارت آزمایشگاه خشک کرده و بوسیله متانول آنها را فیکس نمودیم. این گسترش‌ها با روش اسید فاست رنگ‌آمیزی شده و وجود انگل بررسی و پس از اثبات آلودگی به کریپتوسپوریدیوزیس، در نمونه اولیه (بدون فیکساتور) پس از شستشو، اسیست‌های آن جداسازی و شمارش شدند (۱۰).

جهت رنگ‌آمیزی اسید فاست ابتدا گسترش‌های فیکس شده را با کربول فوشین رنگ‌آمیزی نموده و به مدت ۵-۲ دقیقه آنها را حرارت داده تا رنگ اضافی بخار شود، سپس با آب و اسید الکل ۳٪ شستشو داده تا رنگ فوشین ناپدید شود. اسیست‌های کریپتوسپوریدیوم رنگ فوشین را به خود گرفته و در مرحله بعدی با مالاشیت گرین ۰/۵٪ به مدت ۵ دقیقه آن را رنگ نمودیم. شستشو با آب و خشک کردن لام در هوای آزمایشگاه انجام شد سپس با میکروسکوپ نوری لنز ۱۰۰ مشاهده انگل انجام شد و به این ترتیب نمونه‌های آلوده به کریپتوسپوریدیوم شناسایی شدند (۱۰،۹).

برای استخراج اسیست‌ها و تغلیظ آنها بعد از اینکه نمونه مثبت شناسایی شد آن را به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰g سانتریفیوژ نموده و در دمای $4^{\circ}C$ در محلول تازه K_2CR_2O نگهداری کردیم. قبل از استفاده، اسیست‌ها دو بار در محلول سرم فیزیولوژی شسته شده و با روش فلوتاسیون سوکروز تغلیظ شدند. تکنیک گرادیانت منقطع ساکارز برای جداسازی اسیست‌های کریپتوسپوریدیوم بر اساس شناورسازی نمونه در محلول قندی بنا شده است. با مخلوط نمودن ۳۲۰cc محلول سرم فیزیولوژی یا PBS با ۵۰۰ گرم ساکارز محلول شیترز تهیه شد. ۵cc از نمونه مدفوع صاف شده که در K_2CR_2O نگهداری می‌شد در ترکیب فوق ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس با انکوباسیون ۲۴ ساعته، اسیست‌ها در این محلول هیپرتونیک، سبک‌تر شده به سطح این مخلوط آمده و سپس به وسیله پیپت آنها را از سطح جداکرده و در محلول PBS و در دمای $4^{\circ}C$ برای دو هفته نگهداری نمودیم (۱۰،۹).

برای ایجاد یک مدل حیوانی مناسب برای کشت کریپتوسپوریدیوم و بررسی فیزیوپاتولوژی این انگل، دو گروه موشهای Inbred شامل Balb/c و C57bl/6 (تهیه شده از بخش پرورش حیوانات آزمایشگاهی، انستیتو پاستور ایران، مجتمع تولیدی تحقیقاتی کرج) را انتخاب کردیم. ۱۵ سر C57bl/6 و ۱۵ سر Balb/c ماده ۴ تا ۶ هفته و با وزن ۱۵ تا ۲۰ گرم برای این مطالعه در نظر گرفته شدند. هر گروه از موشها به سه دسته تقسیم شدند: گروه سالم (Naive) که به آنها فقط سرم فیزیولوژی تزریق شد. گروه شاهد که به آنها دگزامتازون تزریق شد و گروه آزمون که به آنها علاوه بر تزریق دگزامتازون، اسیست کریپتوسپوریدیوم تلقیح شد. دگزامتازون (Sigma, Chemical Co. UK) با فرمول شیمیایی (C22H29FO5) بعنوان داروی سرکوب‌کننده ایمنی و دوز تزریقی ۱۲۵μg/day بصورت داخل صفاقی و به مدت ۱۴ روز تزریق شد.

برای حصول اطمینان از ایجاد نقص ایمنی و تایید آن، لنفوسیت‌های طحال موشهای گروه سالم و آزمون را جدا نموده و با سیتوژن Con-A کشت دادیم. سه روز پس از تحریک به سلول‌ها، تایمیدین نشاندار اضافه نموده پس از ۱۸ ساعت سلول‌ها را جدا نموده و با استفاده از مایع سنتیلاسیون و بتاکانتر میزان تکثیر سلولی را در دو رده بررسی نموده و برای اثبات نقص ایمنی، گروه آزمون با گروه سالم مقایسه شدند.

پس از تایید سرکوب ایمنی با روشهای اختصاصی، اسیست‌های کریپتوسپوریدیوم بصورت خوراکی توسط گاواژ به تعداد 3×10^{4} تلقیح شدند. پس از ایجاد آلودگی تجربی، نمونه‌های مدفوع حیوانات آزمایشگاهی هر روز از نظر وجود اسیست انگل مورد آزمایش قرار گرفت. پس از انجام پاساژهای مکرر و اثبات آلودگی در حیوانات مورد نظر، آنها را با روشهای انسانی کشته و کلیه اجزاء دستگاه گوارش و اندامهای هدف جدا شده و محتویات Lumen در PBS بصورت سوسپانسیون درآمده و از نظر تکثیر انگل مورد بررسی قرار گرفتند. گسترش‌های لازم تهیه شده و نمونه‌های بافتی از نظر پارازیتولوژیک و هیستوپاتولوژیک مورد بررسی قرار گرفتند.

برای بررسی تکثیر انگل در میزبان مدفوع حیوانات در فیکساتور بصورت سوسپانسیون درآمده و با استفاده از Paraseb و پس از ۵ دقیقه در ۳۰۰۰g سانتریفیوژ و رسوب آنها برای شمارش اسیست‌ها مورد استفاده قرار گرفت بطوری‌که پس از تهیه گسترش، آنها را با متانول فیکس کرده سپس رنگ‌آمیزی با روش اسید فاست بر روی آنها انجام شد و در مرحله بعدی، لام‌ها با آب شیر شستشو داده شد، در حرارت آزمایشگاه آنها را خشک نموده و در پایان با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار دادیم.

برای بررسی وجود اشکال خارج گوارشی انگل بعد از اینکه مدفوع موشها بررسی شدند و وجود انگل در آن تایید شد جهت بررسی کریپتوسپوریدیوزیس خارج گوارشی، حیوانات مورد آزمایش پس از بیهوشی مورد عمل تشریح قرار گرفتند، سپس روده را کاملاً بیرون آورده و بخشی از آن را جهت

بررسی بافت شناسی جدا نموده و بقیه آنرا کاملاً با قیچی تکه‌تکه کرده و داخل محلول PBS ریخته تا از نظر وجود ااسیست مورد بررسی قرار گیرد. اندامهای هدف چون کبد، طحال و شش را نیز بیرون آورده، بافتهای حاصله را جهت مطالعه بافت‌شناسی در فرمالین ۱۰٪ قرار داده و گسترش‌های فشاری را از بافتهای فوق تهیه و مورد آزمایش قرار دادیم.

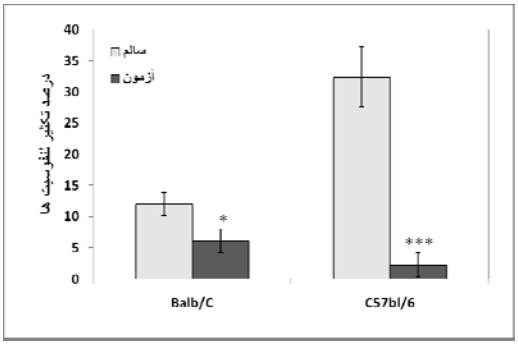
جهت تهیه گسترش فشاری تکه‌ای از بافت مورد نظر را جدا کرده و در یک سانتیمتری لبه لام قرار می‌دهیم. لبه لام دیگر را روی این تکه قرار می‌دهیم سپس ۲ لام را کاملاً به هم فشار داده و در جهت خلاف آنها را می‌کشیم. بافت مورد نظر به صورت یک لایه سلولی روی لام‌ها پخش می‌شود. سپس این لام‌ها را با چند قطره متانول فیکس کرده و سپس به روش ذیل نلسون رنگ‌آمیزی نموده تا وجود ااسیست را در آن بررسی کنیم (۹،۱۰).

بافتهای جدا شده از روده، شش، کبد و طحال نگهداری شده در فرمالین جهت مطالعات هیستوپاتولوژیک به آزمایشگاه تحقیقات بالینی انستیتو پاستور ایران منتقل و مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از قرار دادن بافت در فرمالین ۱۰٪ به‌مدت ۴۸ ساعت، آن را در دستگاه Tissue processor پاس دادیم و به طور اتوماتیک طبق زمان‌بندی در این ظرفها که محتوی فرمالین ۱۰٪، الکلهای ۸۰٪، ۹۶٪، ۱۰۰٪، گزیلول و در نهایت پارافین مذاب بودند، قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها توسط دستگاه ذوب پارافین قالب‌گیری شدند و قالبی مکعبی شکل از پارافین که محتوی بافت مورد نظر است به دست آمد. پس از آن دستگاه میکروتوم را روی ۳ میکرون تنظیم نمودیم و از قالبهای پارافینی برش‌گیری نموده، آنها را روی لام قرار داده و سپس به ظرف محتوی الکل ۳۰ درجه منتقل کرده و بعد با آب ولرم پارافین آن را ذوب کرده و بر روی لام با چسب سفیده تخم‌مرغ و گلیسرین منتقل نموده و ۳۰ دقیقه در ۸۰ درجه قرار داده تا پارافین داخل بافت مورد نظرکاملاً ذوب شود. جهت رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، ابتدا بافت را در گزیلول قرار داده تا پارافین اضافی آن ذوب شود سپس در الکلهای ۱۰۰، ۹۰، ۸۰ و۷۰ درجه در هر یک به مدت ۵ دقیقه قرار دادیم. در نهایت، نمونه‌ها را با آب مقطر شستشو داده و آن را در ظرف حاوی هماتوکسیلین به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده و با آب جاری شستشو و در اسید الکل پاساژ داده، مجدداً با آب جاری شستشو نموده و بعد در کربنات لیتیم قرار دادیم. سپس لام را تمیز کرده در ائوزین قرار داده و سپس شستشو با آب جاری و در الکلهای ۷۰، ۸۰، ۹۰ و۱۰۰ درجه در هر یک به مدت ۵ دقیقه قرار دادیم. سپس نمونه‌ها را در گزیلول قرار داده و سرانجام جهت حفظ و تثبیت برش رنگ‌آمیزی شده لامل را روی لام با چسب کانادا بالزام چسباندیم (۱۲).

نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری Graph Pad Prism و آزمون آماری Student's t-Test تجزیه و تحلیل شد. سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ قرار داده شد.

یافته‌ها

در بررسی کریپتوسپوریدیوزیس در نمونه‌های حیوانی و انسانی، نتایج حاصله سطح پایین آلودگی را در دامداریهای منطقه مورد بررسی در حومه شهر آمل و در مراکز بهداشتی داخل شهر نشان می‌دهد به طوری‌که میزان آلودگی در نمونه‌های حیوانی ۲/۵٪ و در نمونه‌های انسانی صفر بوده است. در بررسی محتویات دستگاه گوارش مشخص شد در محتویات گوارشی ۲۰٪ از موشهای Balb/c و ۸۰٪ از موشهای C57bl/6 ااسیست‌های کریپتوسپوریدیوم وجود دارد (شکل ۱، $p<۰/۰۰۱$). موشهای C57bl/6 درصد بالایی از آلودگی را نشان دادند. ۴۰٪ آنها پس از آلودگی مردند، در صورتی‌که موشهای Balb/c مقاومت بیشتری نشان دادند و همه آنها تا پایان آزمایش زنده ماندند ($p<۰/۰۵$).



شکل ۱- نتایج حاصل از کشت لنفوسیت‌های طحال در دو گروه از موشهای همخون C57bl/6 و Balb/c: مقایسه تکثیر لنفوسیت‌های طحال در گروه آزمون در مقایسه با گروه سالم در روز هشتم پس از سرکوب ایمنی با دگزامتازون در دو گروه از موشهای همخون C57bl/6 و Balb/c. (*$p<۰/۰۵$، ($p<۰/۰۰۱$)**

برشهای بافتی اندامهای کبد، طحال، روده و ریه در گروههای مورد مطالعه (آزمون، شاهد، سالم) که به شیوه هماتوکسیلین - ائوزین رنگ‌آمیزی شده بود نشان داد این بافتها کاملاً سالم بوده و هیچگونه آلودگی در آنها دیده نشد، بطوری‌که کریپتوسپوریدیوزیس خارج گوارشی در نمونه‌های آزمایش شده مورد تایید قرار نگرفت.

سیستم ایمنی موشها بر اثر تزریق دگزامتازون تضعیف شد بطوری‌که موشهای C57bl/6 حساستر از موشهای Balb/c در تقابل با آلودگی بودند. بررسی کشت لنفوسیتی موشها در گروه شاهد نیز نشانگر آن بود که سطح ایمنی در موشهای C57bl/6 به میزان بیشتری نسبت به موشهای Balb/c کاهش یافته است. بنابر این موشها جهت تکثیر و بررسی کریپتوسپوریدیوم مناسبتر هستند.

بحث

با توجه به اینکه کریپتوسپوریدیوزیس در میزبان با ایمنی کامل خودمحدود شونده است و حتی در مواردی بدون علائم است، یافتن ااسیست انگل براحتی صورت نمی‌گیرد. با توجه به اینکه دفع ااسیست‌ها به طور تصادفی صورت می‌گیرد در افراد بدون علائم و با نقص ایمنی نیز یافتن ااسیست انگل مشکل است (۱۲). از طرفی چون حجم کمی از نمونه مدفوع در آزمایشات بررسی می‌شود، ممکن است این امر به خطای آزمایشگاهی در عدم تشخیص نمونه‌های آلوده منجر شود که حتی در نمونه‌های مبتلا به گاستروانتریت، میزان آلودگی پایینی گزارش شده است (۱۷).

بررسی میزان آلودگی در موشهای گروه آزمون نشان داد سیستم ایمنی آنها که پس از تزریق دارو تضعیف شده بود موجب تسهیل آلودگی به کریپتوسپوریدیوم در این موشها شد و این آلودگی در گروه C57bl/6 بیشتر از Balb/c بوده است. بررسی کشت لنفوسیتی موشها در گروه شاهد نیز نشانگر آن است که سطح ایمنی در موشهای C57bl/6 به میزان بیشتری نسبت به موشهای Balb/c کاهش یافته است، بنابراین، موشهای C57bl/6 جهت تکثیر و بررسی کریپتوسپوریدیوم مناسبتر می‌باشند. گرچه بررسیهای کشت لنفوسیتی نشانگر افت سیستم ایمنی است، ولی عواملی همچون مزمن شدن بیماری در یک بازه زمانی طولانی جهت پیشرفت بیماری و نفوذ آن به بافتهای خارج گوارشی از ضروریات است.

اثرات سرکوب کنندگی دگزامتازون در مطالعات متعددی مورد اثبات قرار گرفته است، بطوری‌که Petry و همکاران ایمنی موشهای بالغ C57bl/6 را با دگزامتازون سرکوب کردند و با تلقیح ااسیست انگل آنها به کریپتوسپوردیوزیس مبتلا شدند (۱۲). Rasmussen و همکاران، دوزهای مختلف دگزامتازون را جهت سرکوب ایمنی در موشها بررسی کردند و مشخص شد که دوز۱۲۵µg/l/dبهترین دوز برای سرکوب ایمنی جهت ایجاد کریپتوسپوریدوزیس مزمن است (۱۸). در این بررسی این دوز جهت سرکوب ایمنی به کار گرفته شد. در تحقیقی که Brasseur انجام داد به رت‌های ایمونوساپرس شده به وسیله هیدروکورتیزون استات، 10^5 ااسیست کریپتوسپوریدیوم خورانده شد و این رت‌ها چند روز بعد علائم بیماری را بروز دادند (۱۴). در تحقیق Petry و همکاران به موشهای ایمونوساپرس 10^6 ااسیست کریپتوسپوریدیوم تلقیح شد (۱۲). شاید یکی از دلایل عدم مشاهده کریپتوسپوریدیوزیس خارج گوارشی در مطالعه حاضر تعداد کم ااسیست‌های تلقیح شده (3×10^4 ااسیست/موش) پایین بودن سطح آلودگی و عدم نفوذ تک‌یاخته مذکور به بافتها است.

در بررسی بر روی گسترش‌های فشاری و برشهای رنگ‌آمیزی شده هیچ انگلی یافت نشد. سویه انگل به کار رفته در این تحقیق C. parvum گاوی بود. بررسیهای انجام شده توسط Baishanbo و همکاران که بر روی موش‌کورهای با ایمنی سرکوب شده و مبتلا به C. parvum گاوی انجام شد، عفونت صفراوی در آنها مشخص شد (۱۹). بررسیهای انجام شده توسط Novak و همکاران بر روی موشهای Balb/c تازه متولد شده که ایمنی آنها سرکوب شده بود نشان داد C. parvum در بافتهای پانکراس و کیسه صفرای آنها نفوذ کرده است. بنابراین سویه انگل به کار رفته نه تنها بافتهای گوارشی بلکه بافتهای خارج گوارشی را نیز آلوده می‌کند (۱۵). به نظر می‌رسد طول دوره عفونت در این بررسی کوتاه بوده است به طوری که انگل حتی تکثیر روده‌ای محدودی داشته است و لزوم ایجاد کریپتوسپریدیوزیس خارج گوارشی، آلودگی مزمن غیر درمان شده است (۲۱،۲۰).

مطالعه حاضر موید تکثیر انگل کریپتوسپوریدیوم در حیوانات آزمایشگاهی با ایمنی سرکوب شده است ولی میزان تکثیر آن به گونه موش، میزان نقص ایمنی و تعداد انگل تلقیح شده بستگی دارد. اگر بخواهیم به طور اساسی روی کشت و تکثیر، شناخت ساختار و عملکرد انگل و راههای درمان آن کار کنیم در ابتدا لازم است تا جهت تکثیر فراوان انگل اقدام نماییم و محیطهای کشت و مدل‌های حیوانی مناسب را شناسایی کنیم. زیرا یکی از مشکلاتی که ما در این مسیر داشتیم تهیه ااسیست کافی جهت آلوده کردن موشها بوده است. در گام بعدی لازم است که محیط آزمایشگاهی ایزوله‌ای را ایجاد کنیم زیرا سرکوب ایمنی باعث افت مقاومت این حیوانات می‌شود به‌طوری‌که حیوانات ایمونوساپرس نسبت به انواع عوامل بیماریزا بسیار حساس هستند و به علت پایین بودن سطح ایمنی به راحتی در معرض عفونتهای ناشی از محیط قرار می‌گیرند. به علاوه بهتر است به جای استفاده از یک مدل حیوانی ایمونوساپرس از مدل‌های مختلفی استفاده کرد.

موشهای با جهش nude، بدون تیموس و موشهایی که با مواد سرکوب کننده دیگر مهار ایمنی شده‌اند احتمالا برای این منظور گزینه‌های مناسبی هستند (۲۲-۲۰). بنابراین کوتاه بودن دوره آزمایش در مطالعه حاضر به انگل فرصت کافی نداده تا به بافتها نفوذ کند. در ضمن باید تلاش شود تا یک عفونت مزمن کریپتوسپوردیایی در این مدل‌ها ایجاد شود زیرا لازمه ایجاد کریپتوسپوریدیوزیس خارج گوارشی ایجاد عفونت مزمن است که به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

نتیجه‌گیری

موشهای C57bl/6 نسبت به Balb/c در آلودگی به کریپتوسپوریدیوزیس حساسیت بیشتری را نشان داده‌اند اما به علت کوتاه بودن طول مدت آلودگی، انگل به بافتهای خارج روده‌ای منتقل نگردید و کریپتوسپوریدیوزیس خارج گوارشی مشاهده نشد.

تقدیر و تشکر

از کلیه کارکنان محترم پژوهشکده انستیتو پاستور ایران در شمال کشور (آمل) به ویژه خانمها امیر بزرگی، امینی و مرادی و همکاران بخش انگل‌شناسی خانمها امینی و نعیمی و آقایان رحمانی و اسفندیاری، پرسنل محترم بخشهای تحقیقات بالینی و ایمونولوژی انستیتو پاستور ایران در تهران که ما را در انجام این مطالعه یاری فرمودند، کمال تشکر را داریم.

REFERENCES

1. Uner A, Inceboz T, Uysalci M, Dagsi H. Immune deficiency and cryptospordiosis in rats. Turk J Vet Anim Sci 2002;27:1187-91.
2. Marques FR, Cardoso LV, Cavasini CE, de Almeida MC, Bassi NA, Almeida MTG, et al. Performance of an immunoenzymatic assay for cryptosporidium diagnosis of fecal samples. Braz J Infect Dis 2005;9(1):3-5.
3. Flanigan TP, Soave R. Cryptosporidiosis. Prog Clin Parasitol 1993:1-20.
4. Keusch GT, Hamer D, Joe A, Kelley M, Griffiths J, Ward H. Cryptosporidia; who is at risk? Schweiz Med Wochenschr 1995;125(18):899-908.
5. Hannahs G. Cryptosporidium parvum: an emerging pathogen. Available at: http://biology.kenyon.edu/slonc/bio38/hannahs/crypto.htm.
6. Juranek DD. Cryptosporidiosis: sources of infection and guidelines for prevention. Clin Infect Dis 1995;21 Suppl 1:S57-61.
7. Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. Cryptosporidium taxonomy. Recent advances and implications for public health. Clin Microbiol Rev 2004;17(1):72-97.
8. Geze MP, Blanchard P, Fourrey JL, Robert-Gero M. Synthesis of sinefungin and its c-6' epimer. J Am Chem Soc 1983;105:7638-40.
9. نهروانیان ح. مطالعه کریپتوسپوریدیوم در بیماران مبتلا به نقص ایمنی در تهران. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران. سال ۱۳۷۲.
10. Nahrevanian H, Assmar M. A case report of cryptosporidiosis and isosporiasis in AIDS patients in Iran. J Trop Med Parasitol 2006;29(1):33-6.
11. Current L, Garcia LS. Cryptosporidiosis. Clin Microbiol Rev 1991;4(3):325-58.
12. Petry F, Robinson HA, McDonald V. Murine infection model for maintenance and amplification of *Cryptosporidium parvum* oocysts. J Clin Microbiol 1995;33(7):1922-24.
13. McDonald V, Deer R, Uni S, Iseki M, Bancroft GJ. Immune responses to Cryptosporidium muris and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. Infect Immun 1992;60(8):3325-31.
14. Brasseur P, Lemeteil d, Ballet, JJ. Curative and preventive anticryptosporidium activities of sinfungin in immunosuppressed adult rat model. Antimicrob Agent Chem 1993;37:889-92.
15. Novak SM, Sterling CR. Susceptibility dynamics in neonatal Balb/c mice infected with *Cryptosporidium parvum*. J Protozol 1991;38(6):S102-S104.
16. Gardner AL, Roche JK, Weikel CS, Guerrant RL. Instestinal cryptosporidiosis pathophysiologic alterations and specific cellular and humoral immune responses in RNU/+ and RNU/RNU athymic rats. Am J Trop Med Hygiene 1991;44(1):49–62.

۱۷. قربانیان ع، نهروانیان ح، امیرخانی ع و همکاران. فراوانی کریپتوسپوریدیوزیس، ایزوسپوریدیوزیس و سایر انگلهای انتروپاتوژنیک در بیماران مبتلا به گاستروانتریت. مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل ۱۳۸۷؛ سال ۱۰ شماره ۲، صفحات ۵۶ تا ۶۷.

18. Rasmussen KR, Healey MC. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. Infect Immun 1992;60(4):1648-52.

19. Baishanbo A, Gargala G, Duclos C, François A, Rossignol JF, Ballet JJ, et al. Efficacy of nitazoxanide and paromomycin in biliary tract cryptosporidiosis in an immunosuppressed gerbil model. J Antimicrob Chemother 2006;57:353-55.

20. Ungar BLP, Burris JA, Quinn CA, Finkelman FD. New mouse models for chronic cryptosporidium infection in immunodeficient hosts. Infect Immun 1990;58:961-69.

21. Nahrevanian H, Assmar M. Cryptosporidiosis in various immunocompromised patients in the Islamic Republic of Iran. J Microbiol Immunol Infec 2008;41(1):74-7.

22. Nahrevanian H, Assmar M, Ghorbani Samin M. Cryptosporidiosis among immunocompetent patients with gastroenteritis in Tehran, I. R. Iran; A comparison with other enteropathogenic parasites. J Microbiol Immunol Infect 2007;40(2):154-56.