فعالية أنواع مختلفة من المصول في نمو الاطوار المتغذية للأميبا الحالّة للنسج (*Entamoeba histolytica*) في الزجاج

زهراء عبد الرحيم أحمد عبد الله* آمنة نصيف جاسم* علي حسين أدحية**

استلام البحث 5، ايلول، 2008
قبول النشر 9، ايار، 2010

الخلاصة:

تم عزل و تنميته الاميبا الحالة للنسج في الزجاج باستخدام الوسطين الزرعيين Locke-egg medium (LEM) و Liver infusion Agar medium (LIAM). ثم درس تأثير بعض أنواع المصول (الخروف والبقر والإنسان) على نمو ونشاط الأميبا في الوسطين الزرعيين.

لوحظ أزدياد معدل التضاعف معنوياً عند تجهيز الوسط الزرعي LEM بمصل الخروف والبقر لتصل النسبة الى 105.5% و142.6% ، على التوالي، كما كان لمصل الانسان من مجموعة الدم A تأثير في رفع معدل التضاعف ولكن بدرجة أقل بالاعتماد على الوسط الزرعي أذ بلغ في وسط LEM 49.1% ووسط LIAM 26.9%.

الكلمات المفتاحية : أستنبات ، الاميبا الحالة للنسج ، مصول

المقدمة :

يعد الخمج بالأميبا الحالّة للنسج واحدة من المشاكل الصحية العالمية ومن أخطر الأمراض المعوية وخاصة في الدول النامية، لذا فأن سرعة ودقة التحري عن هذه الطفيليات يعدّ أساسياً في السيطرة على انتشار داء المتحولات الأميبية، ويعَّد استنبات الطفيلي في الزجاج احدى الطرائق التشخيصية المهمة وخاصة في التجارب المختبرية وبشكل أساس في اختبارات الفوعة [1] . يعد المصل مادة غذائية مهمة في الوسط الزرعي إذ قامت عدة دراسات باستخدام مصل من مختلف أجنة العوائل مثل Foetal calf و Horse و Bovine ولوحظ بأن نقصان تركيز المصل يؤثر على النمو الأميبي في الأوساط الزرعية،

وأكد [2] بأن الأطوار المتغذية للأميبا الحالة للنسج تغلق دورة الخلية (Cell cycle) تحت ظروف انعدام المصل، كما ذكر[3] بأن أهمية المصل ليس لتجهيز المواد الغذائية الضرورية فحسب وإنما يحجب تأثير بعض أنشطة التسمم الخلوي. لذا أجريت هذه الدراسة لمعرفة تأثير بعض أنواع المصول من عوائل مختلفة على نمو ونشاط الطفيلي .

المواد وطرائق العمل:

جمع وعزل الطفيلي من عينة البراز

جمعت عينات البراز من أشخاص بالغين يعانون من الإسهال وغير خاضعين للعلاج والمراجعين لمستشفى اليرموك التعليمي في بغداد خلال الفترة من27 كانون الأول 2004 ولغاية 7 آذار 2005 . وتم التأكد من خمجهم بطفيلي الأميبا الحالّة للنسج من خلال الفحص المجهري للبراز. ثم عزلت الأميبا الحالة للنسج من عينة البراز بأخذ 1غرام من العينة و مزجها مع 3 مل من المحلول الملحي الفسيولوجي ، ومررت خلال طبقة من الشاش المعقم لغرض إزالة الدقائق الكبيرة من المستحلب قبل إضافته الى الوسط الزرعي [4] ، وبعد عزل الأميبا من البراز أضيف 0.5 مل من المستحلب الى أنابيب الوسط الزرعي ثم حضنت الأنابيب بوضع عمودي في الحاضنة بحرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة [4] .

تحضير الأوساط الزرعية

Preparation of Culture Media

حضرت نوعين من الأوساط الزرعية من نوع Xenic culture media ، وهذه الأوساط ذات بيئة ثنائية الطور (Diphasic media) .

أ- الوسط الزرعي Locke- egg medium (LE)

حضر الوسط الزرعي بحسب طريقة(Boeck andDrobohlav,1925) والذي يتكون من طورين:

1. **الطور الصلب** : أن المكون الأساسي لهذا الطور هو محتوى بيض الدجاج والذي يمثل السطح الصلب المائل بمقدار 5 مل.

*قسم علوم الحياة/ كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد
**وحدة الأبحاث البايولوجية للمناطق الحارة /كلية العلوم جامعة بغداد

2. الطور السائل : يتألف هذا الطور من محلول لوكس (Locke's solution) والذي يمثل الطور السائل العلوي إذ أضيف بمقدار 6 مل الى الطور الصلب المائل في انبوبة الزرع .

ب- الوسط الزرعي نقيع الكبد مع الأكار Liver infusion agar medium

حضر الوسط بحسب طريقة (Cleveland and Collier,1930) ويتكون ايضاً من طورين :

1. الطور الصلب : أن المكون الأساسي لهذا الطور هو نقيع كبد البقر(Beef liver infusion) والذي يمثل السطح الصلب المائل بمقدار 5 مل .

2. الطور السائل: يتألف هذا الطور من دارئ المحلول الفسيولوجي والمصل المعقم لدم الخروف بعد تثبيط المتمم ، إذ مزجا بنسبة 1:5. أضيف هذا المزيج (6 مل) والذي يمثل الطور السائل الى الطور الصلب .

المضادات الحيوية Antibiotics

أضيف كل من Streptomycin Sulphate بمقدار 2 ملغم/مل و Procaine Benzylpenicillin بمقدار 1000 وحدة دولية/مل وكذلك اضيف المضاد الفطري Nystatin بمقدار 2 ملغم/مل الى الطور السائل للوسط الزرعي [4].

جمع عينات المصول

جمع مصل الانسان من أشخاص أصحاء من خلال سحب الدم من الوريد من مجموعة تحمل فصيلة الدم AB ومجموعة أخرى تحمل فصيلة الدم A وذلك بعد أجراء اختبار فحص مجاميع الدم ، ووضعت في أنابيب معقمة غير حاوية على مانع التجلط . أما بالنسبة لعينة مصل الخراف والبقر فقد تم سحب الدم من الوريد الوداجي للخراف وللبقر وكذلك وضعت العينات في أنابيب معقمة وخالية من مانعات تجلط الدم. تركت العينات في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة لكي تتجلط ، ثم وضعت في النابذة (2000 دورة/دقيقة) لمدة 15 دقيقة. بعد ذلك سحب الجزء الطافي والذي يمثل المصل ووضع في أنابيب معقمة في الحمام المائي (56 مْ) لمدة 30 دقيقة لتثبيط المتمم ثم رشح بمرشحات غشائية (0.45 مايكرون) لغرض التعقيم ووضع في أنابيب أبندروف معقمة وحفظ بحرارة 20- مْ لحين الاستعمال.

تنمية الطفيلي في الأوساط الزرعية الحاوية على المصول

بعد تحضير الأوساط الزرعية وتهيئتها أضيفت المصول بمقدار 1مل من كل نوع من أنواع المصول الى الطور السائل للأوساط الزرعية البالغة 5 مل لكي يتوازن حجم الطور السائل لكل الأوساط الزرعية المعاملة بالمصول والسيطرة بحيث يكون الطور السائل لجميع الأوساط الزرعية 6 مل ، وحضرت ثلاث مكررات لكل نوع من أنواع المصول إضافة الى مجموعة السيطرة التي كانت فيها الأوساط الزرعية خالية من المصول. بعد ذلك أضيف العالق الأميبي الى الأوساط الزرعية بمقدار 0.08 × 10^6 طور متغذي/ مل من الطور السائل للوسط الزرعي وحضن بحرارة 37 مْ ولمدة 48 ساعة ، وقد تم تحديد كمية العالق الحاوي على الاطوار المتغذية للطفيلي والمضافة للاوساط الزرعية بواسطة شريحة عد الخلايا (Haemocytometer) .

قياس فعالية المعاملة

تم قياس فعالية المعاملة بأستخدام المعادلة الاتية وحسب ماجاء في [4]:

$$\text{فعالية المعاملة}(\%) = [100 - \frac{\text{المعاملة (طور متغذي /مل)}}{\text{السيطرة (طور متغذي /مل)}} \times 100]$$

التحليل الإحصائي Statistical Analysis

حللت النتائج باستخدام اختبار أقل فرق معنوي Least significant Difference (LSD) وكذلك استعمل اختبار دنكن المتعدد المدى Duncan Multiple Range Test بأستخدام البرنامج الاحصائي الجاهز (SPSS).

النتائج:

أستخدم وسطين زرعيين مختلفين أحدهما لا يحوي على المصل (الوسط الزرعي LEM) والآخر حاوٍ على المصل (الوسط الزرعي LIAM) وتم اختيار مصل الخروف في وسط LIAM طيلة مدة البحث ، و لوحظ بأن معدل التضاعف أو النمو للأطوار المتغذية في الوسطين الزرعيين كان متبايناً إذ تراوحت الأطوار المتغذية في وسط LEM من 0.50x 10^6 الى2.46 x 10^6 طور متغذي /مل ، بينما في وسط LIAM فكانت من 0.1 x 10^6 الى2.34 x 10^6 طور متغذي/مل ، وأظهرت نتائج هذه الدراسة وجود فروق معنوية بين معدل التضاعف (Reproduction rate) للوسطين الزرعيين عند مستوى احتمالية ≤0.001 ، أذ بلغ معدل التضاعف في وسط LEM (0.905 x 10^6 /مل) بينما بلغ في وسط LIAM (0.386 x 10^6 /مل) (جدول 1) . إضافة الى معدل التضاعف فقد لوحظ وجود اختلاف بين حجم الطفيلي لكلا الوسطين

الزرعيين، ففي وسط LIAM امتازت الأميبا بكبر حجمها (15-50 مايكرون) مقارنة مع وسط LEM (12-25 مايكرون) ، إضافة الى قلة أعداد الأميبا في وسط LIAM مقارنة بوسط LEM على الرغم من أن كلا الوسطين الزرعيين يحويان نفس السلالة المرضية المعزولة من براز المخمج . أما من ناحية نشاط وحيوية الأميبا فقد كانت متماثلة في كلا الوسطين الزرعيين ، إلا أنه لوحظ سرعة توالي الانقسامات في الاميبا الواحدة في الوسط الزرعي LIAM (شكل 1) إذ انتجت عدة خلايا أميبية بنفس الوقت بينما لم توجد مثل هذه الحالة في وسط LEM إنما كانت الانقسامات اعتيادية وتنتج خليتين بعد كل انقسام ، كما لوحظ أيضاً إمكانية نقل المستنبت من وسط LEM الى وسط LIAM وبالعكس وبدون أي تأثير إذ أظهرت الأميبا قابلية تكيفية مباشرة بعد زرعها.

لذا أجريت بعض التجارب على مصول مختلفة لكل وسط زرعي وذلك بعد إضافة 1 مل من المصل المختار الى 5 مل من الوسط الزرعي وحضنت مع 0.08×10^{6} طور متغذي /مل لمدة 48 ساعة. ففي الوسط LEM لوحظت فروق معنوية عالية لمصل الخروف ومصل البقر عن السيطرة عند مستوى احتمالية ≤0.001 إذ لوحظت نسبة زيادة في معدل التضاعف للأميبا لتصل فعالية المعاملة الى105.5 و142.6% على التوالي، بينما لم يظهرفرق معنوي بين مصل فصيلة دم الإنسان AB والسيطرة، أما مصل فصيلة دم الإنسان A فلوحظ زيادة في معدل التضاعف لتصل فعالية المعاملة الى 49.1% وبفرقٍ معنويٍ عن السيطرة عند مستوى احتمالية ≤0.05 .

أما في الوسط LIAM فكانت فعالية معاملة مصلي دم الإنسان AB و A بنسبة زيادة لتصل الى 76.1 و26.9% على التوالي، اما مصل البقر فتدنت فعالية المعاملة لتصل نسبة التثبيط الى 68.9 % ، وفي غياب المصل أيضاً تدنت فعالية المعاملة لتصل نسبة التثبيط الى 88% وبفرقاً معنوياً عن السيطرة عند مستوى احتمالية ≤0.05 . أما عند المقارنة بين الوسطين الزرعيين فلم يختلفا معنوياً عند مصل دم الإنسان AB، أما في مصل البقر ومصل دم الإنسان A فلوحظت فروق معنوية بين الوسطين الزرعيين عند مستوى احتمالية ≤0.01 (جدول 1).

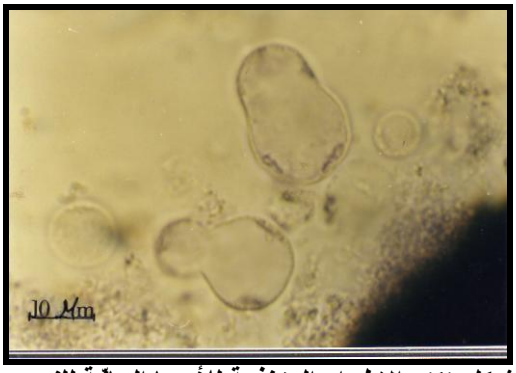
لذا أثبتت النتائج بأن مصل الخروف كان الأنسب والأفضل لكلا الوسطين الزرعيين من حيث معدل التضاعف وحيوية الأميبا إضافة الى كبر حجم الأميبا في كلا الوسطين الزرعيين وسرعة توالي الانقسامات (شكل 2) ، أما مصل البقر فكان كفوءاً في الوسط LEM من حيث معدل التضاعف أما أحجام الأميبا فقد تباينت، أما في الوسط LIAM فكان مصل البقر غير كفوء إذ لوحظ صغر حجم الطفيلي وتناقص أعدادها. أما مصل دم الإنسان AB و A فكان الحجم طبيعي (شكل 3) مع تميز مجموعة A بوجود الانقسامات المتوالية.

جدول (1) : تأثير مصول مختلفة على نمو طفيلي الأميبا الحالة للنسّجٌ والنامية في الوسطين الزرعيين (LEM) و (LIAM).

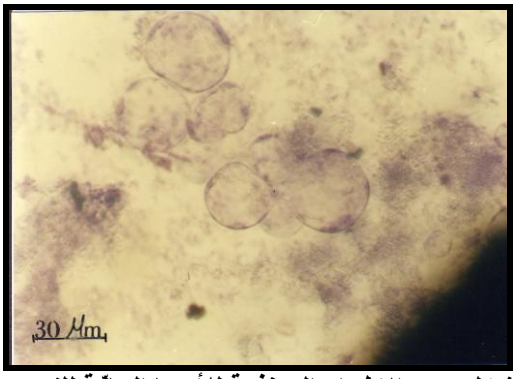
المجاميع		كمية المصل المضاف مل/5 مل وسط زرعي	** معدل أعداد الطفيلي النامية ± الخطأ القياسي× 10^{6}/مل LEM	** معدل أعداد الطفيلي النامية ± الخطأ القياسي× 10^{6}/مل LIAM	فعالية المعاملة (%) في وسطي LEM	فعالية المعاملة (%) في وسطي LIAM	* الاحتمالية ≥
السيطرة		0.00	0.084±0.905 أ	0.085±0.386 أ			0.001
مجاميع المصول	بدون مصل	0.00		0.012±0.046 ب		88-	
مجاميع المصول	مصل البقر	1 ml	0.325±2.196 ب	0.011±0.12 أب	142.6+	68.9-	0.01
مجاميع المصول	مصل الخروف	1 ml	0.104±1.86 ب		105.5+		
مجاميع المصول	مصل الإنسان صنف (AB)	1 ml	0.086±0.663 أ	0.145±0.68 أ	26.7-	76.1+	غير معنوي
مجاميع المصول	مصل الإنسان صنف(A)	1 ml	0.052±1.35 ج	0.14±0.49 أ	49.1+	26.9+	0.01

* الاحتمالية : المقارنة مابين الوسطين الزرعيين LEM و LIAM.

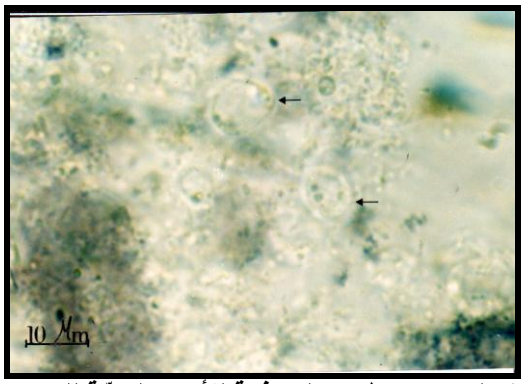
** الاحرف المختلفة : فرق معنوي (الاحتمالية ≤ 0.05) مابين معدلات العمود الواحد .



شكل (1): الاطوار المتغذية للأميبا الحالة للنسج النامية في الوسط الزرعي LIAM الحاوي على مصل الخروف، موضحاً فيه سرعة توالي الانقسامات للأميبا في الوسط الزرعي (ملون لشمان).



شكل (2): الاطوار المتغذية للأميبا الحالة للنسج النامية في الوسط الزرعي LIAM المعامل بمصل الخروف، موضحاً فيه كبر حجم الأميبا (ملون لشمان).



شكل (3): الاطوار المتغذية للأميبا الحالة للنسج النامية في الوسط الزرعي LIAM المعامل بمصل دم الإنسان AB موضحاً فيه حجم الاميبا الحاله للنسج .

المناقشة:

بينت النتائج نجاح عزل الأميبا الحالة للنسج من البراز وتنميتها على الوسطين الزرعيين (LEM) و (LIAM) ، أذ جهز الوسطين الزرعيين بالمواد الغذائية الضرورية للنمو والتي شملت البروتينات والدهون والكاربوهيدرات إلا أن التحليل الأحصائي أظهر وجود فروق معنوية بين الوسطين الزرعيين في معدل التضاعف ، كما لوحظ وجود اختلاف في حجم الاميبا بين الوسطين الزرعيين إذ امتاز وسط LIAM بكبر حجم الأميبا مقارنة بوسط LEM والتي كانت احجامها طبيعية على الرغم من أن السلالة المجهزة لكلا الوسطين الزرعيين من سلالة واحدة، وقد يعود الاختلاف الى طبيعة المواد الغذائية في كلا الوسطين الزرعيين ، ولعل أهم أسباب هذه الفروق هو وجود مصل الخروف في الطور السائل للوسط LIAM ، إذ لوحظ عند إضافة مصل الخروف الى وسط LEM تصبح الأميبا أكبر حجماً ومشابه تقريباً لوسط LIAM، وعلى الرغم من ذلك فقد أثبتا كفاءتهما في تنمية الأميبا في الزجاج.

يؤدي المصل دوراً أساسياً في الأوساط الزرعية وذلك لأحتياج الأميبا الحالة للنسج لبعض متطلبات النمو الاساسية ، وتجهز هذه المواد بشكل رئيسي بواسطة المصل وتعتبر كمصادر خارجية للدهون التي تحتاجها الأميبا [7] ، وقد أكد ذلك [3] والذي اشار الى أن المصل يجهز بعض المواد الغذائية الأساسية لتنمية الأميبا الحالة للنسج مثل الدهون والبروتين وكذلك يستخدم كحاجز لتأثير بعض السموم الخلوية النشطة. أن وجود المصل في الوسط الزرعي يساند نمو الأطوار المتغذية لمدة زمنية طويلة عند إدامته في الزجاج، وتستطيع الأميبا الحالة للنسج أن تنمو بغياب المصل في حالة استبداله بالأحماض الأمينية و الدهون المختلطة كما هو الحال في وسط LEM وهذا ماأكده [8] أذ ذكر بأنه يمكن للأميبا الحالة للنسج ان تنمو بدون مصل إذا استبدل بخليط من الأحماض الأمينية وفيتامينات ودهون بروتينية وكولسترول وشحوم فوسفاتية وأحماض دهنية . وفي حالة عدم استبدال المصل يتوقف نمو الأطوار المتغذية بعد نقل المستنبت مرة أو أثنين في حالة غياب المصل عن الوسط الزرعي ولوحظ ذلك في الدراسة الحالية عند إزالة المصل من وسط LIAM.

كما أظهرت الدراسة سرعة توالي الانقسامات بوجود مصل الخروف وربما يعود ذلك الى دور المصل كعنصر أساسي لحث تقدم دورة الخلية حسب ما ذكره [2] . وقد أظهرت النتائج ايضاً بأن أفضل الأوساط الزرعية لعزل الأميبا الحالة للنسج من عينة البراز بنجاح وتنميتها لمدد طويلة قد تصل الى أكثر من سنة هي الأوساط الزرعية الحاوية على نشأ الرز والمضادات الحيوية والبكتريا الملائمة إضافة الى المواد الغذائية الضرورية للنمو الى جانب وجود مصل الخروف الذي أثبت كفاءته في كلا الوسطين الزرعيين .

المصادر:

1.Sodeman, W.A. 1996. Intestinal Protozoa: Amebas. In: Baron, S. (Ed.). *Medical Microbiology*. 4th ed. Irving Conde. Tullar, United State of America.

2.Vohra, H.; Mahajan, R.C. and Ganguly, N.K. 1998. Role of serum in regulating the *Entamoeba histolytica* cell cycle: A flow cytometric analysis. *Parasitol.Res*., 84:835-838.

3.Barron-Gonzalez, M.P.; Villarreal-Trevino, L.; Verduzco- Martinez, J.A.; Mata-Cardenas, B.D. and Morales-Vallarta, M.R. 2005 . *Entamoeba invadens*: invitro axenic encystations with a serum substitute. *Exp. Parasitol*., 110:318-321.

4.Clark, C.G. and Diamond, L.S. 2002 . Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev*., 15:329-341.

5.Boeck,W.C.and Drobohlav,J. 1925 .The cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Am.J.Hyg*.,5:371-407.Cited by Clark, C.G. and Diamond, L.S. 2002 . Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev*., 15:329-341.

6.Cleveland, L.R. and Collier, J. 1930 . Various improvements in the cultivation of *Entamoeba histolytica* . *Am.J.Hyg*., 12:606-613. Cited by Taylor, A.E.R. and Baker, J.R. 1968 . The cultivation of parasites *in vitro* . Black Well Science Publ., Oxford .pp.120-144.

7.Mata-Cardenas, B.D.; Vargas-Villarreal, J.; Gonzalez-Salazar, F. Martinez-Rodriguez, H.; Morales-Vallarta, M. and Said-Fernandez, S. 2000[a] . *Entamoeba histolytica* is unable to use free cholesterol, phospholipids, and fatty acids under axenic cultivation conditions. *Arch. Med. Res*., 31:S212-S213.

8.Mata-Cardenas, B.D.; Vargas-Villarreal, J.; Martinez-Rodriguez, H.G.; Castro-Garza, J.; Gonzalez-Garza, M.T. and Said-Fernandez, S. 2000[b] . Autotrophy to lipoproteins of *Entamoeba histolytica* cultivated under axenic conditions. *Parasitol.Res*., 86:1018-1021. [Abstract].

The activity of different types of sera on the growth of trophozoite of *Entamoeba histolytica in vitro*

Zahra'a Abdul-Raheem Ahmed* ***Amna N. Jasim****

Ali H. Ad'hiah**

*Department of Biology, College of Science for Women, University of Baghdad.
**Tropical-Biological Research Unit, College of Science, University of Baghdad.

Abstract:

The parasite *Entamoeba histolytica* has been isolated and cultivated *in vitro* via using Locke-egg medium (LEM) and Liver infusion agar medium (LIAM) . After that, the effect of some types of sera (sheep, bovine and human) on the growth and activity of the parasite in the two culture media was investigated.

The reproduction rate has been significantly increased when the sera of sheep and bovine were supplemented to LEM medium to reach 105.5 and 142.6%, respectively. Human blood group (A) serum was also effective, but with a less degree, and such effect was a medium-dependent (LEM: 49.1%; LIAM: 26.9%).