استفاده از سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان برای تکثیر انگل توکسوپلاسما گوندی جهت بررسی‌های سرولوژیکی و مولکولی

صابر رائقی[*]
مصطفی لطیف‌پور[**]
دکتر ناصر ضیا علی[***]
سیمین صدیقی[****]

[*]کارشناس ارشد انگل‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده پزشکی، گروه انگل‌شناسی
[**]کارشناس ارشد علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی
[***] دکترای انگل‌شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده پزشکی، گروه انگل‌شناسی
[****] دانشجوی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی

تاریخ وصول:۱۳۸۶/۹/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۸۶/۱۲/۸

مؤلف مسئول: صابر رائقی
پست الکترونیک: s_raeghi@kmu.ac.ir

چکیده:

مقدمه و هدف: توکسوپلاسما گوندی انگل داخل سلولی اجباری است و از شایع‌ترین انگل‌های مشترک انسان و حیوان است. امروزه مطالعات گسترده مولکولی و اثرات مختلف دارویی بر روی این انگل در حال انجام است و برای تشخیص این انگل در انسان و حیوان از روش‌های مختلف سرولوژیکی و مولکولی استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه استفاده از سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان برای تکثیر انگل توکسوپلاسما گوندی جهت بررسی‌های سرولوژیکی و مولکولی است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در گروه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی کرمان در سال ۱۳۸۶ انجام شده است. پس از تهیه استرین RH انگل توکسوپلاسما گوندی جدا شده از موش آزمایشگاهی و با تهیه سه رده سلولی سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان، سلول‌های سرطانی ریوی و سلول‌های سرطانی کبدی انسان و استفاده از آنها در محیط‌های کشت سلولی با حجم مشخص، با تلقیح تاکی‌زوئیت انگل به محیط‌های کشت حاوی رده‌های سلولی ذکر شده در چندین فلاسک، شرایط رشد و تکثیر انگل در زمان‌های مشخص مورد بررسی قرار گرفت. از محیط کشت بدون سلول نیز برای مقایسه زمان زنده ماندن انگل به طور همزمان استفاده شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس مورد تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: در محیط‌های کشت ورود انگل در ۴۸ ساعت اول مشاهده شد.در روزهای سوم تا ششم میزان رشد انگل در محیط حاوی سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان در مقایسه با سلول‌های سرطانی ریوی و سلول‌های سرطانی کبدی انسان قابل قبول بود. در انتهای روز ششم حجم به دست آمده انگل در محیط سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان بیشتر بود. خاصیت بیماری‌زایی انگل جدا شده از این محیط بر روی موش آزمایشگاهی حفظ شده بود.

نتیجه‌گیری: استفاده از محیط سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان نسبت به سایر رده‌های سلولی برای جداسازی و تکثیر انگل مناسب و مقرون به صرفه است. این رده سلولی می‌تواند محیطی مناسب به جهت تهیه کیت‌های آزمایشگاهی و پژوهشی و تهیه انگل زنده به میزان مطلوب برای بررسی‌های دارویی از این رده سلولی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: تهیه آنتی‌ژن ،کشت سلولی، توکسوپلاسما گوندی، سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان، سلول‌های سرطانی ریوی

مقدمه

توکسوپلاسما گوندی یکی از انگل‌های شایع در دنیا است که به صورت داخل سلولی تکثیر می‌یابد. این انگل در تمام حیوانات خونگرم می‌تواند موجب بروز توکسوپلاسموز گردد. وجود میزبان‌های فراوان این انگل از علل شیوع آن است. گربه‌سانان به عنوان تنها میزبان نهایی انگل، فرم اووسیستی انگل را با مدفوع دفع کرده و تاکی‌زوئیت و برادی زوئیت از مراحل غیر جنسی این انگل در میزبان‌های واسط هستند(۱).

تاکی‌زوئیت توکسوپلاسما در حدود ۵ ـ۳ میکرومتر اندازه داشته و به صورت داخل سلولی و به روش اندودیوژنی تکثیر می‌یابد. زمان تکثیر این انگل در شرایط ایده‌آل ۱۰ـ۶ ساعت است. پس از فراهم آمدن حدود ۱۲۰ـ۱۰۰ انگل در داخل سلول، سلول میزبان پاره شده و تاکی زوئیت‌ها به بیرون آزاد می‌شوند. این انگل با سویه‌های مختلفی شناخته می‌شود که در مجموع می‌توان این سویه‌ها را به سه ژنوتیپ I، II و III تقسیم‌بندی کرد(۲). وجود سایت‌های آنتی‌ژنی بر روی تاکی‌زوئیت انگل در تشخیص‌های مستقیم سرولوژیکی آنتی‌بادی این انگل در میزبان‌ها و نمونه‌های مختلف آنها حایز اهمیت است. از جمله این روش‌ها می‌توان به روش تشخیص آگلوتیناسیون مستقیم[۱] و دای تست[۲] اشاره کرد که هر دو از نظر مقایسه با سایر روش‌های تشخیصی سرولوژیکی این انگل دارای ویژگی و حساسیت بالایی هستند. در آزمون آگلوتیناسیون مستقیم، برای ساخت کیت نیاز به تاکی‌زوئیت فیکس شده با فرمالین با حجم و تعداد خاص است و درآزمون دای تست از انگل زنده به دست آمده از محیط کشت مربوط به این انگل استفاده می‌شود. در این روش‌ها با توجه به استفاده مستقیم از تاکی‌زوئیت، به دست آوردن تعداد زیاد انگل بدون از بین رفتن آنتی‌ژن‌های سطحی تاکی‌زوئیت اهمیت دارد(۳). در حال حاضر عمدتاً جهت تهیه کیت‌های مصرفی برای تشخیص از سویه RH انگل و کشت آن بر روی موش سفید آزمایشگاهی استفاده می‌شود. با گسترش زمینه مطالعاتی ـ تحقیقاتی مولکولی بر روی این انگل و تهیه واکسن، در مواردی کشت و به دست آوردن تعداد مطلوب در سویه‌های حساس آن جهت استخراج دی ان آ[۳] و روش‌های مولکولی اهمیت دارد. لذا بررسی شرایط رشد و نحوه تکثیر انگل در محیط‌های کشت مختلف ضروری به نظر می‌رسد. در زمینه‌های درمانی نیز از آنجایی که اثرات داروهای مختلف بر روی این انگل در نقاط مختلف دنیا برای اثر بخشی داروها روی انگل در حال انجام است، فراهم آوردن محیط مناسب برای کشت این انگل قابل بررسی است(۴).

تیپ I انگل که به سویه RH معروف است، برای ساختن آنتی‌ژن و کیت تشخیصی در آزمون سرولوژیکی روش تشخیص آگلوتیناسیون مستقیم و دای تست مورد استفاد قرار می گیرد. این سویه

1-Modified Agglutination Test (MAT)
2-Dye Test
3-DNA

قدرت تکثیر فراوانی دارد. موش سوری در برابر سویه RH مقاومت کمی داشته و با گذشت ۵ـ۳ روز پس از تزریق داخل صفاقی خواهد مرد. به همین جهت نگهداری انگل بر روی موش آزمایشگاهی مستلزم صرف وقت و هزینه خواهد بود(۵). کشت انگل بر روی موش در مواردی مشکل است و احتمال آلودگی آن و از بین رفتن سایت‌های آنتی‌ژنی در داخل مایع صفاقی موش وجود دارد، لذا استفاده از محیط‌های کشت سلولی می‌تواند مقرون به صرفه و باعث افزایش ضریب اطمینان تهیه آنتی‌ژن برای آزمون های سرولوژیکی مستقیم و تهیه دی ان آ برای کارهای مولکولی، بررسی حساسیت دارویی و به دست آوردن سویه‌های انگلی باشد(۶).

هدف از این مطالعه استفاده از سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان برای تکثیر انگل توکسوپلاسما گوندی جهت بررسی‌های سرولوژیکی و مولکولی است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان در سال ۱۳۸۶ انجام شده است. در مراحل مختلف انجام این کار ابتدا نیاز به تهیه کردن تاکی‌زوئیت‌های سویهRH انگل توکسوپلاسما گوندی و به دست آوردن انگل تازه جهت کشت در محیط‌های مورد نظر است. این سویه به صورت داخل صفاقی به موش تزریق شده و پس از سه روز برای جلوگیری از آلودگی باکتریایی پس از مرگ، موش به وسیله اتر کشته شده و مایع صفاقی پس از تزریق ۲ـ۱ میلی‌لیتر بافر فسفاته جمع‌آوری می‌گردد. مایع به دست آمده از فیلتر شماره ۲۷ چند بار عبور داده شده و پس از آن با دور ۱۰۰۰ در حدود ۳ دقیقه سانتریفیوژ خواهد شد. سپس ۳ بار با محلول هانکس[۱] شستشو داده شده و تاکی‌زوئیت به تعداد 10^3 عدد تاکی‌زوئیت در هر میلی‌لیتربا استفاده از لام نئوبار تنظیم می‌شود.

سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان[۲] از ژله وارتون بند ناف جنین انسان پس از تولد به روش سزارین به دست می‌آید. پس از انتقال بند ناف به آزمایشگاه در داخل محلول هانکس حاوی آنتی‌بیوتیک، زیر هود لامینار و در شرایط استریل عروق بند ناف را جدا کرده و ژله وارتون را به قطعه‌های ۵ میلی‌متری تقسیم و آنها را در داخل پلیت کشت گذاشته و حدود ۱ میلی‌لیتر محیط کشت به آن اضافه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت حدود چند میلی‌لیتر محیط کشت دیگر به آن‌ها اضافه کرده وآن‌ها را از نظر رشد جوانه‌های سلولی مورد بررسی روزانه قرار داده شد. پس از گذشت ۱ هفته جوانه‌های سلولی از قطعات ژله رشد کرده و سپس قطعه‌ها را با پنس بیرون انداخته و زمانی که سلول‌ها حدود ۹۰ درصد سطح پلیت را پوشاندند آنها پاساژ داده شد. این سلول‌ها به سلول‌های پاساژ I معروفند. این سلول‌ها آماده کشت و انجام آزمایش‌های مختلف بودند. رده سلول‌های سرطانی ریوی انسان[۳] و سلول‌های سرطانی کبدی انسان[۴] به صورت آماده از

1-Hanks
2-Human Umbilical Cord Matrix Cells (HUCM)
3-A549
4-Hpe2

انستیتو پاستور تهران قابل تهیه هستند. جهت انجام کشت، کلیه رده های سلولی در محیط هانکس و در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربع و با افزودن مکمل‌های لازم، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر)، استرپتومایسین(۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)،سدیم بی‌کربنات و ۱۰ درصد سرم جنین گاو کشت داده شدند(۸ و ۷).

با تهیه محیط‌های کشت و پس از ۲۴ ساعت از کشت رده‌های سلولی و رسیدن سلول‌ها به تعداد تقریبی پانصد هزار، به هر کدام از فلاسک‌ها کوچک 10^3 عدد تاکی‌زوئیت به محیط کشت اضافه گشته و سپس حجم محیط‌ها در هر فلاسک به ۸ میلی‌لیتر رسانده شد و در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی اکسید کربن ۵ درصد انکوبه می‌شود. از آنجایی که مقدار pH محیط به علت فعالیت بیوشیمیایی انگل و سلول‌های محیط کشت تغییر می‌کند، لذا وجود pH خنثی از شرایط رشد بهینه سلول‌هاست. در نتیجه آن هر ۲۴ ساعت یک بار ضمن سنجش pH محیط، نحوه ورود و تعداد احتمالی انگل در حجم خاص محیط کشت مورد بررسی قرار گرفته و پس از عبور برای پاره شدن سلول‌های حاوی انگل از سر سوزن نازک شماره ۲۷ استفاده شد(۹). در نهایت پس از گذشت ۱۶۸ ساعت توانایی تاکی‌زوئیت استحصال شده از محیط کشت[1] برای از بین بردن موش آزمایشگاهی با تزریق انگل به تعداد 10^2 عدد به موش مورد بررسی قرار گرفت. به عنوان کنترل به گروهی از موش‌ها محیط کشت بدون انگل تزریق شد. کشت انگل در هر سه محیط کشت در ۵ نوبت و ۱۰ سری در هر نوبت مورد مطالعه قرار گرفت و میانگین تعداد انگل به دست آمده به تفکیک ساعت شمارش محاسبه گشت. سپس برای مقایسه بیشترین تعداد انگل به دست آمده در سه محیط کشت از آزمون آنالیز واریانس[2] و نرم‌افزار SPSS [3] استفاده گردید.

یافته‌ها

با تزریق 10^2 عدد تاکی‌زوئیت به حجم ۸ میلی‌لیتری محیط کشت حاوی رده‌های سلولی، پس از ۴۸ ساعت از کشت هم زمان انگل و سلول‌های انسانی تاکی زوئیت‌ها در هر سه محیط کاملاً وارد سلول‌ها شده بودند که این مؤید شروع مرحله تکثیر داخل سلولی است. در این مرحله حدود ۹۵ درصد سلول‌ها آلوده به انگل شده بودند. پس از گذشت ۹۶ ساعت از زمان کشت، تعداد انگل آزاد در محیط حاوی سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان در حدود 10^4 عدد در کل حجم فلاسک برآورد شد. در مورد محیط‌های حاوی سلول‌های سرطانی ریوی و سلول‌های سرطانی کبدی انسان تعداد انگل به ترتیب 10^3 و $6/8\times10^3$ محاسبه شد. در طی زمان ۱۲۰ ساعت پس از کشت، تعداد انگل در محیط حاوی سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان بیش از 10^5 عدد بود، ولی در محیط‌های حاوی سلول‌های سرطانی ریوی و سلول‌های سرطانی کبدی انسان کمتر از $5/8\times10^4$ اندازه‌گیری شد. ۱۴۴ ساعت پس از

1-Dubleco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM)
2-One Way ANOVA
3-Statistical Package for Social Sciences

کشت نیز تعداد سلول‌های محیط حاوی سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان در حدود $۱۰^{۶}$ عدد محاسبه گردید، ولی در محیط‌های حاوی سلول‌های سرطانی ریوی و سلول‌های سرطانی کبدی انسان کمتر از ۲×۱۰^{۴} محاسبه شد. در ۱۶۸ ساعت پس از کشت میزان انگل در محیط سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان در حدود $۴/۲\times ۱۰^{۵}$ محاسبه شد، در حالی که در دو محیط دیگر تعداد انگل به شدت تقلیل یافته و کمتر از $۱۰^{۴}$ شمارش شد. متوسط pH برای محیط‌های کشت سلولی سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان، سلول‌های سرطانی ریوی و سلول‌های سرطانی کبدی انسان به ترتیب؛ ۶/۷،۹/۱ و ۶/۴ محاسبه شد(جدول ۱).

در روز ۶ مطالعه پس از تزریق $۱۰^{۲}$ عدد انگل به دست آمده از هر سه محیط کشت به جهت تعیین حفظ توانایی مرگ و میر سویه RH توکسوپلاسما گوندی به صورت داخل صفاقی به موش سوری، از بین رفتن موش‌ها پس از گذشت ۶ روز از تزریق مشاهده شد. مایع صفاقی موش‌ها پس از مردن آنها جمع‌آوری و وجود تاکی‌زوئیت در مایع با مشاهده میکروسکوپی تأیید شد. موش‌های کنترل که فقط محیط کشت به آنها تزریق شده بودند، زنده ماندند.

بحث و نتیجه‌گیری

در حال حاضر مطالعات مولکولی و بررسی اثرات دارویی مختلف و طراحی واکسن برای انگل توکسوپلاسما گوندی در حال انجام است. فراهم آوردن انگل و به دست آوردن فرم فعال یا تاکی‌زوئیت این تک یاخته برای انجام این نوع مطالعات ضروری است(۱۰). توانایی زنده ماندن انگل در محیط‌های کشت و به دست آوردن حجم مطلوبی از آن برای بررسی‌های دیگر آزمایشگاهی از اهداف کشت این انگل در محیط‌های کشت آزمایشگاهی است(۱۱). هدف از این مطالعه استفاده از سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان برای تکثیر انگل توکسوپلاسما گوندی جهت بررسی‌های سرولوژیکی و مولکولی است.

جدول ۱: میانگین تعداد انگل‌های به دست آمده از محیط کشت و pH آنها در ساعات مختلف

محیط	زمان(ساعت)	۹۶	۱۲۰	۱۴۴	۱۶۸
سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان	تعداد انگل	$۱۰^{۴}$	$>۱۰^{۵}$	$۱۰^{۶}$	$۴/۲\times ۱۰^{۵}$
	pH	۷/۱	۷/۱	۷	۶/۹
سلول‌های سرطانی ریوی	تعداد انگل	$۱۰^{۴}$	$>۵/۸\times ۱۰^{۴}$	$>۲\times ۱۰^{۴}$	$۱۰^{۴}$
	pH	۶/۸	۶/۶	۶/۵	۶/۳
سلول‌های سرطانی کبدی انسان	تعداد انگل	$۶/۸\times ۱۰^{۳}$	$>۵/۸\times ۱۰^{۴}$	$>۲\times ۱۰^{۴}$	$۱۰^{۴}$
	pH	۶/۸	۶/۴	۶/۳	۶/۳

در این بررسی زمان، نحوه و توانایی ورود انگل و حضور آن در داخل سلول‌های محیط کشت در هر سه رده مورد توجه قرار گرفت. به نظر می‌رسد هیچ تفاوتی در نحوه و زمان ورود انگل به داخل سلول‌های مورد بررسی وجود نداشته باشد، ولی با گذشت زمان و فرصت دادن به انگل جهت تکثیر و به دست آوردن تعداد خاص و مطلوب انگل تفاوت‌هایی وجود دارد. در زمان‌های طولانی می‌توان تعداد بیشتری انگل از محیط کشت سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان به دست آورد که یکی از مزیت‌های استفاده از این رده سلولی است. همچنین انگل زمان بیشتری در محیط حاوی این رده سلولی زنده خواهد ماند. به دست آوردن انگل زنده و به تعداد کافی در ساخت کیت در روش سرولوژیکی مستقیم حایز اهمیت است.

بررسی تغییرات و خصوصیات قبلی انگل پس از کشت صرفاً از طریق توانایی تاکی‌زوئیت سویه RH برای از بین بردن موش سوری انجام شد. برای تغییرات آنتی‌ژنیکی لازم است پس از تهیه کیت آزمون سرولوژیکی مستقیم اصلاح شده، حساسیت و ویژگی انگل‌های به دست آمده از محیط کشت برای تشخیص سرولوژیکی نسبت به انگل‌های استحصال شده از موش سوری مورد بررسی قرار گیرد.

مطالعات قبلی نشان دادند که سلول‌های سرطانی کبدی انسان نمی‌تواند اصولاً به عنوان محیطی مناسب جهت ازدیاد و تکثیر انگل مورد استفاده قرار گیرد. هارمر و همکاران[1](۱۹۹۶) از کشت سلولی سلول‌های سرطانی کبدی انسان برای تولید انبوه انگل سویه RH و BK استفاده کرده‌اند، ولی این کشت سلولی به علت تغییرات آنتی‌ژنیکی بر اثر شرایط خاص محیط کشت، برای مطالعات فیزیولوژیکی و آنتی‌ژنی انگل مناسب تشخیص داده نشده است(۱۲). در این مطالعه هدف استفاده از محیط کشت سلول‌های سرطانی کبدی انسان صرفاً کنترل رشد و مقایسه با نحوه رشد و تکثیر انگل با توجه به نتایج مطالعات قبلی بوده است. در این بررسی رده سلولی سلول‌های سرطانی ریوی است. در شرایط مساوی با رده سلولی سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان مقایسه شد. ظاهراً تغییر ساختارهای موجود در این سلول‌ها فرصت تکثیر انگل را کاهش می‌دهند. این تغییرات و عوامل مربوط به آن می‌تواند به عنوان پیش زمینه مطالعات بیشتر قرار گیرد، ولی در کل می‌توان گفت که این رده سلولی نمی‌تواند به عنوان یک رده سلولی مناسب برای رشد این انگل باشد. هر چند در مطالعات برتولی و همکاران[2](۱۹۹۵)نشان داده شده است که انگل در شرایط ایده‌آل دما و محیط می‌تواند با سرعت در این محیط‌ها تکثیر یابد(۱۳). از لحاظ اقتصادی با توجه به تهیه راحت و مناسب سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان شرایط بهتری برای تکثیر انگل و تهیه کیت فراهم می‌آید.

1-Harmer et al
2-Bertoli et al

تغییرات pH در محیط های کشت سلولی به علت شرایط رشد سلول‌ها اهمیت دارد. تغییرات در محیط های کشت سلول‌های سرطانی بیشتر بوده و تمایل به pH اسیدی در آن زیاد است. به همین جهت شرایط رشد و تکثیر انگل کاهش می یابد. در مطالعات دی‌وراک و هاو[1](۱۹۷۷) تمایل نفوذ و رشد تاکی‌زوئیت انگل با تغییر سن و فاز سلول‌های محیط کشت نشان داده شده است. همچنین حفظ شرایط اپتیمم در رشد انگل از نظر دما و دی اکسید کربن اهمیت دارد(۱۴).

می‌توان گفت در صورت عدم رعایت نکات مربوط به کشت به دست آوردن تعداد زیادی انگل در مقیاس بسیار بالا با استفاده از سیستم‌های کشت سلولی کار دشواری است، ولی این نوع هم‌آوری انگل جهت بررسی‌های مولکولی در محیط حاوی سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان قطعاً می‌تواند به عنوان یک راه مناسب باشد. با توجه به مطالعه دیاب و الباهی[2] می‌توان با تغییر میزان مواد محیط کشت حتی توان تکثیر و رشد انگل‌ها را مطلوب‌تر نمود(۱۵).

نیاز به مطالعه بیشتر و عملکرد سویه‌های مختلف انگل بر روی محیط کشت سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان لازم است. چنانچه احتمالاً سویه‌های مختلف انگلی عملکرد غیر مشابه با دیگر سویه‌ها دارد و انتخاب محیط کشت با رده خاص سلولی جهت کشت و تکثیر باید مورد نظر قرار گیرد(۱۶).

با توجه به نتایج مطالعه انجام شده می‌توان گفت که محیط سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان می‌تواند به عنوان محیطی مناسب برای تکثیر و به دست آوردن مقدار قابل قبول برای تولید آنتی‌ژن در مقیاس کوچک و تولید دی ان آ برای کارهای مولکولی و سنجش دارویی باشد.

تقدیر و تشکر

از کلیه اساتید و کارکنان گروه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان که باعث فراهم آمدن امکانات شدند، کمال تشکر را داریم.

1-Dvorak & Howe
2-Diab & El – Bahy

Using Human Umbilical Cord Matrix Cells (HUCM) for Culturing Toxoplasma gondii for Serological and Molecular Assays

Raeghi S[*], Lateifpor M[**], Zia-Ali N[***], Sadighi S[****].

[*]MSc of Parasitology, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
[**]MSc of Anatomy, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
[***]Assistant Professor of Parasitology, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
[****]Veterinarian Student, Faculty of Veterinary, Urmia University

KEYWORDS:
Antigen Preparation,
Cell Culture,
Toxoplasma gondii ,
HUMC ,
A549

Received: 18/9/1386
Accepted: 8/12/1386

Corresponding Author: Raeghi S
Email: s_raeghi@kmu.ac.ir

ABSTRACT:

Introduction & Objective: Toxoplasma gondii is an intracellular parasite and one of the most common parasites between human and animals. Nowadays the molecular methods are being used for the diagnosis. Many molecular and drug assays have been performed on this parasite. Many serological and molecular methods are available for detection of this parasite. The aim of this study was to use human umbilical cord matrix cells for propagation of Toxoplasma gondii for serological and molecular assays.

Materials & Methods: In this experimental study, performed in Kerman Medical University, RH strain of tachyzoite of Toxoplasma gondii was isolated from mice and cultured in HUMC, A549 and Hep2 media. The growth and generation conditions of cultured parasite in different times were studied. DMEM medium was used to compare the viability of parasite. The obtained data were analyzed by variance analysis using SPSS software.

Results: Parasite entry to cell line was observed in the fist 48 hours of culturing in all media. In day 3-6, propagation of parasites in HUMC cell line was better than other cultures. In the late 6th day volume of cultivated parasites in virulence was acceptable.

Conclusion: Use of human umbilical cord matrix cells is a suitable and inexpensive method for proliferation of Toxoplasma gondii. Using these cell lines are useful in providing live parasite for research purposes, drug assays or making laboratory kits.

REFERENCES:

1.Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton Florida: CRC press; 1988; 91-106.
2.Darde ML. Genetic analysis of the diversity in Toxoplasma gondii. Ann Ist Super Sanita 2004; 40(1): 57-63.
3.Ashburn D, Evans R, Chatterton J, Joss A,Ho-Yen D. Toxoplasma dye test using cell culture derived tachyzoites. Journal Clinincal Pathology 2000; 53: 630–3.
4.Booth KS, James ER, Popiel I. Cryopreservation of an attenuated vaccine strain of the protozoan parasite Toxoplasma gondii. Cryobiology 1996; 33(3):330-7.
5.Mavin S, Joss AW, Ball J, Ho-Yen DO. Do Toxoplasma gondii RH strain tachyzoites evolve during continuous passage? Journal of Clinical Pathology 2004; 57(6):609-11.
6.Mavin S, Evans R, Chatterton J, Ashburn D, Joss A, Ho-Yen D. Toxoplasma gondii from liquid nitrogen for continuous cell culture: Method to maximize efficient retrieval. British Journal of Biomedical Science 2003; 60: 217-20.
7.Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, et al. Materix cells from Wharton's Jelly Neurons and Gila. Stem Cells 2003; 21:50-60.
8.Weiss ML, Medcetty S, Bledsoe AR, Rachakatala RS, Choi M, Merchav S, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of parkinsons disease. Stem Cells 2006; 24 :781-92.
9.Jean MW, Chatterton R, Evans D, Ashburn, Joss A, Ho-Yen D. Toxoplasma gondii in vitro culture for experimentation. Journal of Microbiological Methods 2002 ;51: 331–5.
10.Appleford PJ, Smith JE. Toxoplasma gondii: The growth characteristic of three virulent strains. Acta Tropica 1997; 65: 97-104.
11.Meerschman F, Rettigne C, Focnt C, Boreux R, Pinset C, Leclipteux T, et al. Use of a serum-free medium to produce in vitro Neospora caninum and Toxoplasma gondii tachyzoites on Vero cells. Veterinary Research 2002; 33: 159–68.
12.Harmer C, Hassl A, Kreinecker S, Aspock H. Toxoplasma gondii in vitro cultivation economic and efficient mass production. J Microbial Methods1996; 27: 225-8.
13.Bertoli F, Espino M, Arosemena JR, Fishback JL, Frenkel JK. Aspectrum in the pathology of toxoplasmosis in patient with AIDS. Archives of Pathology and Laboratory Medicine 1995; 119: 214-24.
14.Dvorak JA, Howe CL. Toxoplasma gondii-vertebrate cell intractions,the influence of biocarbonate ion, CO_2 ,pH and host cell culture age on invasion of vertebrate cells in vitro. Journal of Parasitology 1977; 24: 416-19.
15.Diab MR, EL-Bahy MM. Toxoplasma gondii: Virulrnce of tachyzoites in serum free media at different temperatures. Experimental Parasitology 2008; 118: 75-9.
16.Siverman JA. Joiner KA. Toxoplasma-host cell interaction. In: Kaufmann SHE(editor). Host response to intracellular pathogens. Austin TX: R G Landes; 1997; 313–38.