BRIEF REPORT

Improved Acanthamoeba Culture Method Using TYM Medium

Hajar Ziaei Hezarjaribi[1],
Tooran Nayeri Chegeni[2],
Yousef Dadimoghadam[2],
Fariba Khoshzaban[3],
Fatemeh Ghaffarifar[4],
Mahdi Fakhar[1]

[1]Associate Professor, Molecular and Cell Biology Research Center, Department of Parasitology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] PhD Student in Medical Parasitology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medical Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
[4] Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received December 31 , 2017 ; Accepted March 11, 2017)

Abstract

Background and purpose: *Acanthamoeba* species are ubiquitous amphizoic organisms which can cause lethal diseases, such as keratitis and encephalitis in domestic animals and humans. The first stage in studies related to *Acanthamoeba* is achieving abundant amount of amoebae in culture medium. The aim of this study was to evaluate TYM medium as a rich medium for the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis in corneal scrapes.

Materials and Methods: In this experimental study, we used one species of *Acanthamoeba* that was previously genotyped. *Acanthamoeba* was cultured in five plates of non-nutrient agar (NNA) medium with *E.coli* without TYM and in five plates of non-nutrient agar containing *E.coli* and TYM. Amoebae growth was observed for 24 to 48 hours by invert microscope.

Results: According to current results using TYM medium increased the growth of trophozoites 8.8 folds and amoebas can be isolated form medium after 24 to 48 hours.

Conclusion: Due to the significant growth of *Acanthamoeba* in NNA improved medium, it is recommended for agglutination and early detection of *Acanthamoeba* in clinical and environmental samples.

Keywords: *Acanthamoeba*, Trophozoite, NNA medium, TYM medium

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (160):156-160 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-17]

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۰ اردیبهشت سال ۱۳۹۷ (۱۶۰-۱۵۶)

بهینه سازی روش کشت آکانتاموبا با استفاده از محیط کشت TYM

هاجر ضیایی هزارجریبی[۱]
توران نیری چگنی[۲]
یوسف دادی
فریبا خوش زبان[۳]
فاطمه غفاری فر[۴]
مهدی فخار[۱]

چکیده

سابقه و هدف: گونه‌های آکانتاموبا، ارگانیسم‌های آمفی زوئیکی هستند که در همه جا یافت می‌شوند و می‌توانند بیماری‌های کشنده‌ای مانند کراتیت و آنسفالیت را در انسان و حیوانات اهلی ایجاد کنند. اولین گام در مطالعات مرتبط با آکانتاموبا، دستیابی به مقدار زیاد آمیب در محیط کشت است. هدف اصلی مطالعه حاضر ارزیابی محیط TYM به عنوان یک محیط غنی برای تشخیص کراتیت‌های آکانتاموبایی در خراش قرنیه بوده است.

مواد و روش ها: یک گونه آکانتاموبا که قبلاً ژنوتیپ شده بود، در این مطالعه تجربی مورد استفاده قرار گرفت. آکانتاموبا در پنج پلیت کشت آگار غیرمغذی ۱/۵ درصد (Non-nutrient agar) (NNA) همراه باکتری اشرشیاکلی (*E.coli*) و بدون اضافه کردن TYM و پنج پلیت آگار غیرمغذی ۱/۵ درصد به همراه باکتری *E.coli* با محیط TYM کشت داده شد. رشد آمیب با میکروسکوپ معکوس بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که افزودن محیط TYM، رشد تروفوزوئیت‌ها را ۸/۸ برابر افزایش می‌دهد و آمیب ها را می‌توان بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت از محیط جدا کرد.

استنتاج: با توجه به رشد قابل توجه آکانتاموبا در محیط کشت NNA بهینه شده، استفاده از این محیط برای انبوه‌سازی و شناسایی به موقع آکانتاموبا در نمونه‌های بالینی و محیطی توصیه می‌شود.

واژه های کلیدی: آکانتاموبا، تروفوزوئیت، محیط آگار غیر مغذی، محیط کشت TYM

مقدمه

آمیب های فرصت طلب آزادزی متعلق به جنس آکانتاموبا، معمولاً در منابع محیطی مختلف مانند آب، فاضلاب، خاک و هوا یافت می‌شوند(۱). آکانتاموبا عامل ایجاد عفونت‌های انسانی مانند انسفالیت آمیبی گرانولوماتوز کشنده (amoebic encephalitis Granulomatous) و کراتیت آمیبی (Amoebic keratitis) دردناک و تهدیدکننده بینایی است(۱). اسمیر قرنیه، کشت و PCR روش‌های فعلی برای شناسایی این انگل هستند(۲). کشت آکانتامبا روشی مفید برای تولید مقدار مناسب از انگل برای اهداف مختلف تشخیصی، برای بهبود دانش ما در مورد روابط انگل- میزبان و برای تعیین ویژگی‌های مولکولی، بیولوژیکی و ایمنولوژیکی انگل است(۵-۳).

مولف مسئول: مهدی فخار- ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاه پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: mahdif53@yahoo.com
۱. دانشیار، گروه انگل شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشجوی دکتری تخصصی انگل شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۴. استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۱۰/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۶/۱۱/۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۱۲/۲۰

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-17]

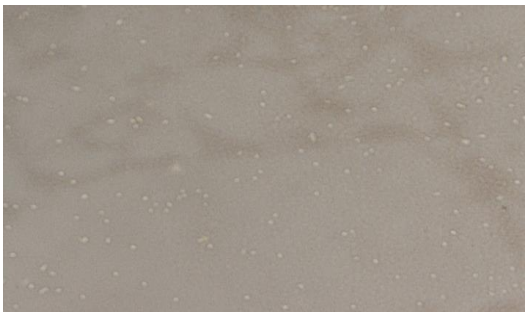
لازم به ذکر است که ایزوله‌های آکانتامبا اعم از نمونه‌های محیطی و بالینی نیاز به کشت در محیط آگار غیرمغذی دارند(۲). محیط کشت مایع PYG (پپتون، عصاره مخمر و گلوکز) برای رشد آکانتاموبا بیش‌ترین کاربرد را دارد(۷،۶). لازم به ذکر است که محققان عمدتاً از PYG برای کشت اگزنیک آمیب استفاده می‌کنند با این حال شکست در این محیط کشت یک پدیده معمول است. به‌علت این‌که محققین برای انجام کارهای تحقیقاتی روی آکانتاموبا به مقادیر زیاد آمیب نیاز دارند، به کارگیری روشی برای تولید مقادیر زیاد انگل در زمان کم در محیط کشت جهت کارهای مولکولی و اهداف دارویی ضروری است. محیط کشت TYM (تریپتیکاز، عصاره مخمر و مالتوز) می‌تواند رشد گونه‌های آکانتاموبا را تقویت کند. به‌طورکلی پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر بیش‌تر محیط TYM در آگار غیرمغذی استفاده می‌شود. مزیت استفاده از این محیط دستیابی به میزان بالایی از تروفوزوئیت‌ها در ۲۴ تا ۴۸ ساعت اول کشت است.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی محیط TYM طبق دستورالعمل تهیه شد(۸). یک نمونه بالینی آکانتاموبا که قبلاً ژنوتیپ شده و با کد KU877552 در بانک ژن ثبت شده بود، در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت آگار غیرمغذی توسط آب مقطر استریل و باکتو آگار (به میزان ۷ درصد) تهیه شد و سویه‌های آکانتاموبا به محیط اضافه شدند و سپس ۲۰ تا ۵۰ میکرولیتر از محیط TYM به پلیت اضافه گردید. پلیت در دمای اتاق نگهداری شد و بعد از ۲۴ ساعت، رشد آمیب با میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار گرفت. در پلیت‌های کنترل فقط محیط کشت NNA حاوی باکتری اشریشیا کلی (*E.coli*) وجود داشت.

یافته ها و بحث

افزودن محیط مایع TYM به محیط آگار غیر مغذی منجر به بهبود رشد آمیب در ۲۴ تا ۴۸ ساعت بعد از غنی‌سازی با محیط TYM شد. در این روش می توان در مدت ۴۸ ساعت مقادیر زیادی تروفوزوئیت از آمیب به دست آورد و این تروفوزوئیت‌ها را برای اهداف گوناگون مورد استفاده قرارداد (تصاویر شماره۱و۲).



تصویر شماره ۱: رشد آمیب بعد از ۴۸ ساعت در حضور TYM

تصویر شماره ۲: رشد آمیب بعد از ۴۸ ساعت بدون TYM

بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای محیط، میانگین تعداد تروفوزوئیت‌های رشد کرده در محیط NNA حاوی باکتری *E.coli* و بدون حضور TYM در هر شان میکروسکوپ با بزرگنمایی 10× ، ۱۳/۵۴±۲۴ و میانگین تعداد تروفوزوئیت‌های رشد یافته در محیط NNA که TYM به آن افزوده شده بود، در هر شان میکروسکوپ با بزرگنمایی 10× ، ۲۴/۱۲±۲۱۲ بود (جدول شماره ۱). در حقیقت پس از ۴۸ ساعت افزایش رشد ۸/۸ برابر در محیط حاوی TYM مشاهده شد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-17]

جدول شماره ۱: نتایج مربوط شمارش تروفوزویت های آکانتوموبا در محیط کشت آگار غیر مغذی با و بدون حضور TYM

محیط کشت آگار غیر مغذی حاوی باکتری *E.coli*(تعداد تروفوزوئیت)	محیط کشت آگار غیر مغذی حاوی TYM(تعداد تروفوزوئیت)
۱۳	۲۲۸
۱۸	۱۸۸
۱۴	۱۸۴
۴۵	۲۴۰
۳۰	۲۲۰
میانگین ۲۴	میانگین ۲۱۲
انحراف معیار ۱۳/۵۴	انحراف معیار ۲۴/۱۲

تمام گونه‌های آکانتامبا در محیط کشت NNA همراه یک باکتری مناسب مثل *اشرشیاکلی* به عنوان منبع تغذیه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کنند(۱۱-۹). گونه‌های جدا شده از بیماران در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و بالاتر نیز دارای رشد هستند. از کشت برای شناسایی گونه‌های آکانتامبا، مطالعه بیماری‌زائی، تست حساسیت در برابر داروهای ضد میکروبی استفاده می‌شود(۱۳-۱۰). با توجه به این که برای مطالعات درمانی، بیوشیمیایی و مولکولی به مقادیر زیاد آمیب نیاز است، محققان به دنبال محیط کشتی هستند که در این محیط، انگل حداکثر رشد را داشته و در حداقل زمان، بیش‌ترین مقدار آمیب را برای محقق فراهم کند. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ توسط راهدار و همکاران، ۱۱۰ نمونه آب و خاک از مناطق مختلف اهواز جمع‌آوری و نمونه‌ها فیلتر شده و روی محیط NNA کشت داده شدند. کشت اگزنیک برای تمام ایزوله‌های مثبت، انجام شد. برای اگزنیک کردن از محیط TYI-S-33 (تریپتیکاز، عصاره مخمر و آهن) استفاده شد. کشت اگزنیک در محیط PYG موفق نبود اما در محیط TYI-S-33 آمیب در یک زمان کوتاه رشد قابل توجهی را نشان داد. مهم ترین یافته این مطالعه معرفی TYI-S-33 برای کشت اگزنیک آکانتاموبا بود. کشت اگزنیک در محیط PYG نیاز به میزان بالایی کیست دارد. علاوه بر این رشد در این محیط به زمان طولانی نیاز دارد که برای رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها شرایط مناسب را فراهم می‌کند. در حالی که کشت در محیط TYI-S-33 نیاز به مقدار بسیار کمی کیست دارد و آمیب سریعاً رشد کرده و در نتیجه می‌تواند رشد باکتری و قارچ را از بین ببرد(۱۴).

در مطالعه نیتی و همکاران، ۱۰ ایزوله آکانتاموبا کشت، کلون و ژنوتیپ شدند و از محیط TYI-S-33 غنی شده برای کشت استفاده شد. رشد آکانتاموبا روزانه مورد بررسی قرار گرفت. پلیت‌های بدون محیط TYI-S-33 غنی شده به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت نشان داده شد که محیط TYI-S-33 غنی شده یک روش مناسب برای به دست آوردن ۱۰۰ درصد تروفوزوئیت‌ها در طول ۲۴ ساعت اولیه کشت است(۱۵).

در مطالعه Eroglu و همکاران، برای اگزنیک کردن از محیط های مختلف RPMI 1640، Encystation media (EM)، Mycological peptone-maltose media (MPM) و PYG استفاده شد. تکثیر آکانتاموبا در دومین روز در تمام محیط‌های اگزنیک افزایش یافت. بیش‌ترین افزایش رشد در محیط RPMI 1640 دیده شد. در EM، MPM، PYG تعداد آکانتاموبا بین روزهای ۶ و ۸ بالا بود. تعداد آکانتاموبا در محیط‌های اگزنیک به جز محیط RPMI 1640 بعد از دهمین روز کاهش یافت. با توجه به حفظ میزان رشد طولانی مدت، بهترین میزان رشد با استفاده از محیط RPMI 1640 حاصل شد. براساس نتایج این مطالعه محیط RPMI 1640 سریع‌ترین و آسان‌ترین روش کشت برای رشد آکانتاموبا معرفی شد. مطالعات در مورد رشد آکانتاموبا برای توسعه واکسن و دارو برای درمان عفونت آکانتاموبا مهم است. در نتیجه این مطالعه، محیط RPMI 1640 و NNA به ترتیب بهترین محیط‌های اگزنیک و مونوگزنیک بودند که در مطالعات واکسن، دارو و پاتوژنیسیتی آکانتاموبا استفاده شدند(۱۶). مطالعه حاضر نشان داد که افزودن یک محیط مایع غنی مثل TYM می‌تواند روش مناسبی برای رشد مقادیر زیاد آمیب در ۲۴ تا ۴۸ ساعت اولیه باشد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-17]

References

1. Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev 2006; 30(4): 564-595.
2. Khan NA. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. Microb Pathog 2003; 34(6): 277-285
3. Borin S, Feldman I, Ken-Dror S, Briscoe D. Rapid diagnosis of *acanthamoeba* keratitis using non-nutrient agar with a lawn of E. coli. J Ophthalmic Inflamm Infect 2013; 3(1): 40.
4. Mathers WD, Nelson SE, Lane JL, Wilson ME, Allen RC, Folberg R. Confirmation of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using polymerase chain reaction analysis. Arch Ophthalmol 2000; 118(2): 178-183.
5. Lorenzo-Morales J, Martínez-Carretero E, Batista N, Álvarez-Marín J, Bahaya Y, Walochnik J, et al. Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and Hartmannella. Parasitol Res 2007; 102(1): 167-169.
6. Axelsson-Olsson D, Olofsson J, Ellström P, Waldenström J, Olsen B. A simple method for long-term storage of *Acanthamoeba* species. Parasitol Res 2009; 104(4): 935-937.
7. Ahmed N. *Acanthamoeba*. Biology and pathogenesis. UK: Norfolk: Caister Academic Press; 2009.
8. Garcia L. Diagnostic medical parasitology. 2007. Washington DC: American Society for Microbiology; 2001.
9. Penland RL, Wilhelmus KR. Comparison of axenic and monoxenic media for isolation of *Acanthamoeba*. J Clin Microbiol 1997; 35(4): 915-922.
10. De Jonckheere J. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. Appl Environ Microbiol 1980; 39(4): 681-685.
11. Sissons J, Alsam S, Jayasekera S, Khan NA. Ecto-ATPases of clinical and non-clinical isolates of Acanthamoeba. Microb Pathog 2004; 37(5): 231-239.
12. Cao Z, Jefferson DM, Panjwani N. Role of carbohydrate-mediated adherence in cytopathogenic mechanisms of *Acanthamoeba*. J Biol Chem 1998; 273(25): 15838-15845.
13. Alizadeh H, Neelam S, Hurt M, Niederkorn JY. Role of contact lens wear, bacterial flora, and mannose-induced pathogenic protease in the pathogenesis of amoebic keratitis. Infect Immun 2005; 73(2): 1061-1068.
14. Rahdar M, Niyyati M, Salehi M, Feghhi M, Makvandi M, Pourmehdi M, et al. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from environmental sources in Ahvaz City, Khuzestan Province, Southern Iran. Iran J Parasitol. 2012; 7(4): 22-26 (Ppersian).
15. Niyyti M, Dodangeh S. Enrichment of *Acanthamoeba* Culture Medium Using TYIS 33 Medium: a Step toward a Successful Axenic Cultivation. Novelty in Biomedicine 2015; 3(2): 69-72 (Persian).
16. Eroğlu F, Evyapan G, Koltaş İS. The cultivation of *Acanthamoeba* using with different axenic and monoxenic media. Middle Black Sea Journal of Health Science 2015; 1(3): 13-17.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-17]