تشخیص سریع سیتولوژیکی کریپتوسپوریدیوزیس در جوجه‌ها

مترجم: دکتر محمدرضا عظیمی
کارشناس مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام همدان

چکیده

در این مقاله روشی برای بازرسی سریع سیتولوژیکی اووسیست کریپتوسپوریدیائی در نمونه‌های گرفته شده از نای که به روش دیف کوئیک [1] و اسید فاست‌کین یان اصلاح شده [2] رنگ‌آمیزی شده‌اند معرفی شده است ، در نمونه رنگ‌آمیزی شده با روش دیف کوئیک، اووسیست کریپتوسپوریدیایی به صورت چسبیده به انتهای رأسی سلولهای اپیتلیال تنفسی و یا به صورت پراکنده در روی لام مشاهده میشوند، این اووسیستها به شکل گرد تا بیضی شکل و به قطر تقریبی ۷-۶ میکرومتر و به رنگ آبی کمرنگ با دانه‌های صورتی نمایان میشوند، و در نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده به روش اسید فاست کین یان اصلاح شده اووسیستها معمولاً [3] به رنگ صورتی تا قرمز روشن در یک زمینه آبی مشاهده میشوند. آزمایش سیتولوژیکی نمونه‌های نائی به دنبال رنگ‌آمیزی دیف‌کوئیک و اسید فاست‌کین یان اصلاح شده، روش سریع، قابل اعتماد و اقتصادی در تشخیص کریپتوسپوریدیوزیس تنفسی در طیور میباشد.

مقدمه

کریپتوسپوریدیوزیس، بیماری وابسته به رشد می‌باشد و از نظر اقتصادی در صنعت طیور حائز اهمیت است، بیماری به وسیله یک انگل کوکسیدیائی که قسمت راسی سلولهای اپیتلیال را مبتلا و در آن ازدیاد می‌یابد ایجاد میشود. اگر چه معمولاً کریپتوسپوریدیوزیس طیور همراه با عفونتهای روده‌ای بوده ولی این انگل توأم با عفونتهای دستگاه تنفسی در جوجه‌ها، بوقلمونها، بلدرچین، مرغ جنگلی، قرقاول و طاووس نیز مشاهده شده است. کریپتوسپوریدیوزیس تنفسی اغلب همراه با علائمی نظیر ترشحات چشمی و بینی، سینوزیت، سرفه، عطسه، تنگی‌نفس [3] و کاهش فعالیت در طیور میباشد.

تشخیص کریپتوسپوریدیوزیس تنفسی عموماً با تکیه بر آزمایشات بافت شناسی و یا میکروسکوپ الکترونی روی بافت‌هائی که در کالبدگشائی به دست می‌آیند، صورت میگیرد. تشخیص سیتولوژیکی کریپتوسپوریدیوزیس تنفسی در بوقلمونها به وسیله آزمایش میکروسکوپی ترشحات التهابی به روش Wet-mount صورت گرفته است، ولی محققین دریافته‌اند که عموماً اووسیستها دیده نخواهند شد و اگر هم حضور داشته باشند تمایز آنها از ذرات سلولی بوسیله میکروسکوپ نوری مشکل خواهد بود.

در دومین گزارش، در نمونه سیتولوژی نائی که‌از یک طاووس در کالبدگشائی گرفته شده بود و متعاقب رنگ‌آمیزی گرم مورد آزمایش قرار گرفت، ذرات کوچک کروی شکلی به قطر ۱/۵ تا ۲ میکرومتر چسبیده به سلولهای اپیتلیال مشاهده شد، و اجسامی موزی شکل و گرم‌منفی با اندازه ۳/۵×۰/۷ میکرومتر به خوبی قابل تشخیص بودند.

با توجه به مطالعات قبل، بعد از اینکه بیماری به وسیله آزمایشات بافت‌شناسی و میکروسکوپ الکترونی تشخیص داده شد، این اجسام را به عنوان مراحل *Cryptosporidium* sp تفسیر کردند.

طی یک بررسی همه جانبه و دوراندیشانه بیماری تنفسی در جوجه‌ها، ما از سیتولوژی به عنوان کمک و تائید در تشخیص بیماری استفاده می‌کنیم، شناسائی سیتولوژیک موارد متعددی از کریپتوسپوریدیوزیس تنفسی در جوجه‌ها انگیزه انجام این تحقیق بوده است.

مواد و روش کار

جوجه‌ها

به عنوان بخشی از مطالعات همه جانبه در مورد بیماری تنفسی در جوجه‌ها، یک پروتکل سیتولوژیک برای ارزیابی نمونه‌های تهیه شده از نای مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در کالبدگشائی نمونه نای به وسیله و تماس سطح مخاط آن بر روی یک لام میکروسکوپی تمیز به ابعاد ۷۵×۲۵ میلیمتر تهیه میشود. اگر مقدار اکسودا زیاد بود نمونه را مشابه لام خونی تهیه می‌کنیم، نای را به آرامی چندین بار روی یک کاغذ جاذب تماس داده تا اکسودای اضافی حذف شود و گسترش موکوسی چسبیده‌ای ساخته شود. گستره‌های متعددی از هر نمونه نای تهیه می‌شود، تمام نمونه‌های سیتولوژیک تهیه شده، قبل از رنگ‌آمیزی به وسیله هوا خشک می‌شود.

رنگ‌آمیزی دیف‌کوئیک

این روش رنگ آمیزی، تکنیکی از رنگ آمیزی اصلاح شده رایت است که در آن یک گسترش سلولی معمولی در طی ۳۰-۱۵ ثانیه در سه مرحله رنگ آمیزی میشود، کیت رنگ مورد مصرف دارای سه محلول است. محلول اول یک ثابت کننده آبی کمرنگ حاوی تری‌اریل متان [4] ۱/۸ میلی‌گرم در لیتر در متانول است، محلول دوم به رنگ قرمز مایل به نارنجی است و حاوی یک محلول بوفر اثوزین‌وای [5] است، محلول سوم آبی ارغوانی رنگ و حاوی یک محلول بوفر متیلن بلو [6] و آزور-آ [7] (رنگ تیازین) است. رنگ‌آمیزی به وسیله فروکردن گسترش برای مدت ۵ بار در هریک از محلولها به ترتیب (محلول ۳،۲،۱) و به دنبال آن شستشو با آب جاری تکمیل میگردد، گسترش در هوای خشک و با میکروسکوپ نوری بررسی میگردد، در صورتیکه در بررسی اولیه گسترش کم رنگ شده باشد (سلولهای التهابی و یا هسته سلولهای اپیتلیال ارغوانی نشده باشند) میتوان مراحل فوق را همانگونه که شرح داده شد، تکرار نمود.

رنگ‌آمیزی اسید فاست-کین یان اصلاح شده

دراین روش نیز سه محلول به کار رفته: محلول رنگی کاربول فوشین کین‌یان، محلول بی‌رنگ کننده اسید سولفوریک و محلول آبی متیلن به عنوان رنگ

زمینه.

محلول کاربول فوشین‌کین‌یان بصورت تجارتی آماده مصرف است و فقط می‌بایست جهت جلوگیری از ایجاد رسوب آن را قبل از مصرف صاف نمود، در این حالت تا ۶ ماه قابل مصرف است.

محلول بی‌رنگ کننده، اسید سولفوریک ۱۰ ٪ است که به وسیله مخلوط کردن ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ و ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه میشود. این محلول ممکن است تا مدت نامحدودی نگهداری شود، محلول مادر رنگ زمینه به وسیله مخلوط کردن ۰/۷ گرم آبی متیلن و ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ ٪ بدست می‌آید. این محلول پس از عبور از صافی در شیشه‌های نگهدارنده تا مدت سه ماه قابل مصرف خواهد بود. برای استفاده از آن باید ۵ میلی‌لیتر از این محلول را با ۴۵ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کرد.

مراحل رنگ آمیزی اسید فاست -کین یان اصلاح شده

مراحل این رنگ آمیزی با تغییراتی همانند روش Pitlik و همکاران است. بدین ترتیب که پس از خشک شدن نمونه‌ها در درجه حرارت اطاق آنرا به مدت یك دقیقه در متانول مطلق ثابت کرده و در درجه حرارت اطاق خشک نموده، سپس به مدت یک دقیقه در درجه حرارت اطاق در محلول کربول فوشین کین‌یان قرار داده و بعد با آب جاری شسته می‌شود، با استفاده از اسید سولفوریک ۱۰ ٪ تا زمانیکه دیگر رنگ قرمزی از نمونه خارج نشود آن را بی‌رنگ می‌نماید، ازآنجائیکه ضخامت گسترش‌ها متفاوت است، قضاوت در مورد بی‌رنگ شدن از روی بخش نازک گسترش صورت می‌گیرد سپس آنرا با آب جاری شسته و به مدت یک دقیقه در محلول آبی متیلن قرار داده می‌شود، بعداً آنرا سریعاً با آب شسته و سپس نمونه‌ها به وسیله دو یا سه بار فرو کردن در اتانول ۹۵ ٪، اتانول ۱۰۰ ٪، استون ۵۰ ٪، گزیلن ۵۰ ٪ و گزیلن ۱۰۰ ٪ آب‌گیری میشود لام‌های رنگ‌آمیزی شده با استفاده از محیط پایه و لامل شیشه‌ای $1\frac{1}{2}\times 1$ شکل پایدار پوشانده می‌شوند. کل مدت رنگ‌آمیزی ۱۰-۵ دقیقه طول می‌کشد. برای حصول اطمینان از صحیح بودن رنگ آمیزی می‌توان مقطع بافتی مایکوبا کتریوم بدون پارافین را به عنوان کنترل به همین روش رنگ آمیزی نمود.

شناسائی کریپتوسپوریدیا

در روش رنگ آمیزی دیف‌کوئیک، اووسیستها به صورت اجسام کوچک گرد یا بیضی به قطر ۷-۶ میکرومتر که به بخش فوقانی سلولهای اپیتلیال چسبیده‌اند و یا در گسترش پراکنده‌اند دیده میشوند،این اجسام به رنگ آبی روشن با دانه‌های مشخص صورتی دیده می‌شوند. اووسیستهای در حال تکامل، مرونت‌ها[8] یا گامونتها[9] به قطر تقریبی ۳-۲ میکرومتر و به رنگ ارغوانی مایل به آبی و به صورت خوشه‌هائی در مرز بالائی سلولهای اپیتلیال نمایان میشوند (شکل ۱). مروزوئیتها[10] در صورت وجود، هلالی شکل بوده و به اندازه تقریبی ۶×۰/۸ میکرومتر و دارای یک سیتوپلاسم آبی روشن و هسته‌های صورتی -ارغوانی میباشند.

در ثمونه‌های سیتولوژی که به روش اسید فاست‌کین‌یان اصلاح شده رنگ آمیزی شده‌اند، اووسیستها گرد یا بیضی شکل به قطر ۷-۶ میکرومتر و به رنگ صورتی تا قرمز روشن در یک زمینه آبی میباشند. ندرتاً اووسیستها ساختمانهای داخلی را نشان میدهند، اگرچه ممکن است تعدادی از اووسیستها رنگ نشوند اما به سادگی قابل رؤیت هستند (شکل ۲). دیگر مراحل تکاملی این انگل با این روش رنگ آمیزی نمی‌شود.

بحث

با استفاده از تکنیک‌های رنگ آمیزی و سیتولوژی مطابق با آنچه گفته شد، کریپتوسپوریدیوزیس تنفسی در چندین گله در هنگام شیوع بیماری تنفسی در جوجه‌ها تشخیص داده شد، تشخیص سیتولوژیکی متعاقباً در هرنمونه به وسیله بافت‌شناسی و میکروسکوپ الکترونی مورد تائید قرار گرفت. سیتولوژی به تنهائی ممکن است برای تشخیص قطعی کریپتوسپوریدیوزیس تنفسی بکار رود.

براساس تجربیات نویسندگان، سیتولوژی روشی سریع، قابل اعتماد و اقتصادی در تشخیص کریپتوسپوریدیوزیس تنفسی طیور میباشد، هر چند سیتولوژی احتیاج به کشت باکتریائی و قارچی، بافت‌شناسی، سرولوژی و یا جدا کردن ویروسها را منتفی نمی‌کند زیرا کریپتوسپوریدیوزیس ممکن است با دیگر عوامل بیماریزای تنفسی خصوصاً باکتریها، ویروسها و مایکوپلاسماها توأم باشد.

تشخیص سیتولوژیکی کریپتوسپوریدیوزیس تنفسی چندین مزیت را برای متخصصین در بردارد که شامل موارد زیر است:

۱- بعد از کالبدگشائی تهیه نمونه از نای و رنگ‌آمیزی آن ساده و سریع است، به‌علاوه اخذ نمونه با سوآپ از نای مرغ زنده و رنگ‌آمیزی آن امکان‌پذیر است.

۲- معرفهای رنگ آمیزی اقتصادی بوده و تا حدی امکان تکرار و برگشت دارند. (محلولهای دیف‌کوئیک، کاربول فوشین و رنگ زمینه آبی متیلن در روش اسید فاست کین‌یان اصلاح شده)

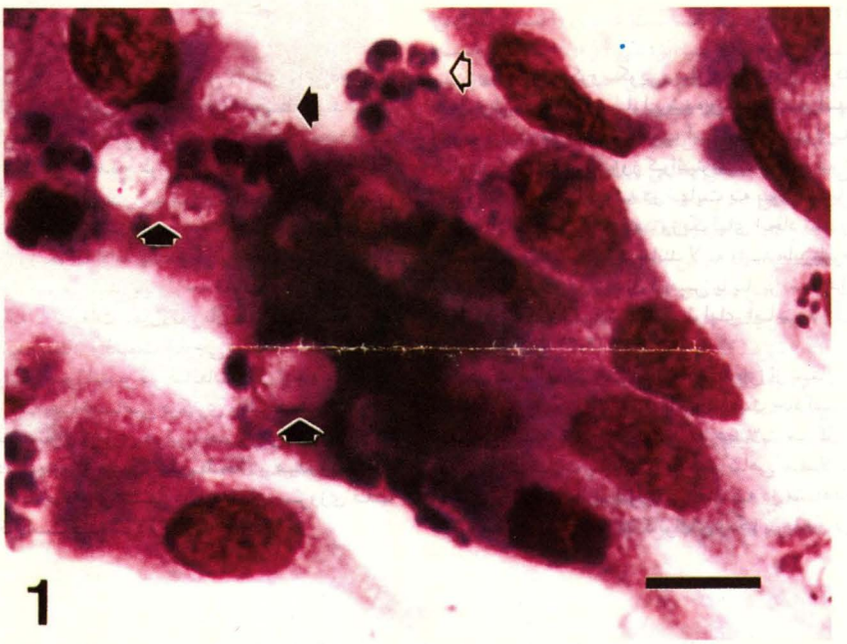
۳- ارگانیسم‌ها هنگام حضور، به سادگی قابل تشخیص هستند و با دیگر عوامل بیماریزای تنفسی اشتباه نمی‌شوند. استفاده از روش اسید فاست اصلاح شده، شناسائی اووسیست کریپتوسپوریدیائی خصوصاً هنگامیکه ارگانیسمها به مقدار کم وجود دارند را میسر میکند، نهایتاً تشخیص سیتولوژیکی ممکن است در عرض چند دقیقه صورت گیرد، در حالیکه در تشخیص بافت‌شناسی ممکن است به ۲۴ تا ۴۸ ساعت و یا بیشتر بسته به روش تهیه بافت - فرآیندها، ارزیابی و گزارش نتیجه، وقت نیاز باشد.

وقتی نمونه سلولی برای آزمایش میکروسکوپی آماده میشود، ممکن است مقدار زیادی اکسودا وجود داشته باشد که در این حالت یك لام از اکسودا و یک لام از مخاط نای باید تهیه شود وگرنه حتی با دقت کافی، عامل کریپتوسپوریدیوم که ترجیحاً در حاشیه راسی سلولهای اپیتلیال جایگزین شده‌اند، به تنهائی در معاینه سیتولوژیکی اکسودا ممکن است دیده نشود.

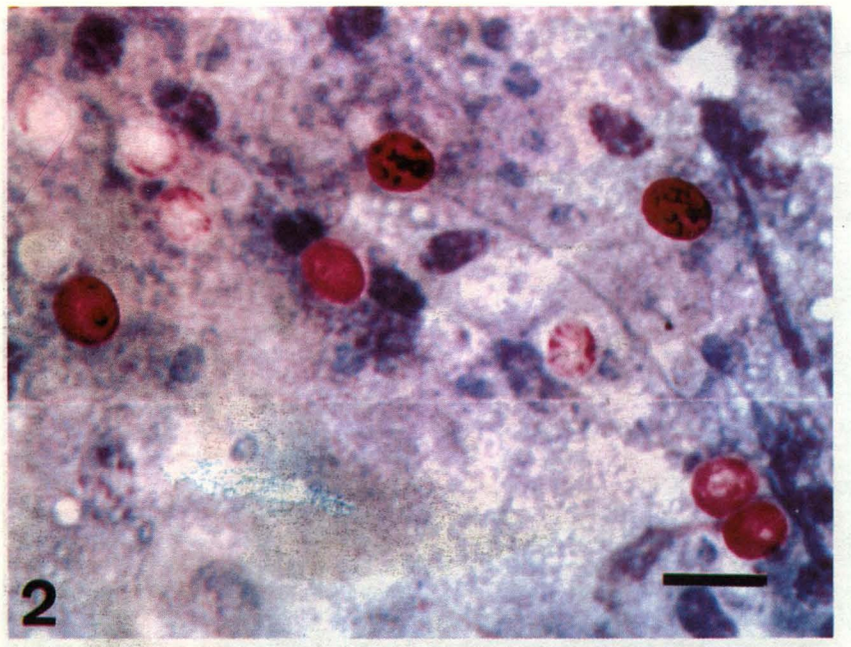
هر دو روش رنگ آمیزی دیف‌کوئیک و اسید فاست‌کین‌یان اصلاح شده قابل اطمینان و آسان میباشند. در روش دیف‌کوئیک نمونه‌های کم‌رنگ ممکن‌است دوباره رنگ شوند، اگر روغن ایمرسیون وجود داشت، با غوطه‌ور کردن لام سیتولوژی رنگ‌شده در گزیلن میتوان آنرا برطرف کرد. بعد از خشک کردن گسترش در هوای اطاق لامها ممکن است رنگ‌آمیزی شوند.

در روش اسید فاست کین‌یان اصلاح‌شده، مرحله رنگ‌بری یک مرحله حساس و بحرانی است و قضاوت براساس مشاهده تغییرات رنگ در بخش نازک لام سیتولوژیکی صورت می‌گیرد، عدم رنگ‌بری کافی ممکن است منتج به رسوب و ابقاء ذرات غیراختصاصی باکربول فوشین شده که مانع از آزمایشات سیتولوژیکی و تفسیر نمونه‌ها می‌گردد. روش رنگ آمیزی اسید فاست‌کین اصلاح شده زمانی عملکرد معتبر دارد که مایکوباکتریاها در بافت شاهد، رنگ شده و به شکل اجسام میله‌ای و قرمز کوچکی مشاهده شوند.

اووسیست‌های کریپتوسپوریدیا در روش تهیه گسترشهای سیتولوژیک بزرگتر (با قطر ۷-۶ میکرومتر) از اووسیست‌های موجود در برشهای بافت‌شناسی به نظر می‌رسند، و این امر احتمالاً به خاطر این است که این موجودات (اجسام) به واسطه عدم تماس با حلالهای آلی آبگیری نمی‌شوند. در جریان متداول تثبیت نسوج با فرمالین به منظور بررسی بافت‌شناسی، این ارگانیسم‌ها (شامل اووسیت‌ها) معمولاً با قطر حدود ۳/۵-۲ میکرومتر دیده می‌شوند، ولی ممکن است تا قطر ۶-۵ میکرومتر هم برسند.



شکل ۱: نمونه نای از یک جوجه با کریپتوسپوریدیوزیس تنفسی، سلولهای اپیتلیال حاوی چندین اووسیت در طول حاشیه راسی (فلش‌های توپر) هستند، خوشه‌های تیره رنگ، بازوفیلیك كروی شكل (فلشهای میان خالی) مراحل تکاملی اووسیست کریپتوسپوریدیا، مرونت‌ها یا گامونت‌ها هستند، رنگ‌آمیزی دیف‌کوئیک (Bar=۱۰ μm)



شکل ۲: اووسیست‌ها به سادگی به عنوان اجسام گرد، کروی کوچک صورتی رنگ تا قرمز در زمینه آبی مشاهده می‌شوند، رنگ‌آمیزی اسید فاست کین‌یان اصلاح شده Bar= ۱۰μm

پاورقی

1- Diff-Quik
2- Modified kinyoun acid fast
3- Dyspenea
4- Triaryl methane
5- Eosin-Y
6- Methylene-blue
7- Azur-A
8- Meronts
9- Gamonts
10- Merozoites

منبع مورد استفاده

Kenneth S. Latimer, Mark A. Goodwin, and M. Kathy Davis, 1988, Rapid cytologic diagnosis of respiratory cryptosporidiosis in chickens. Avian Diseases 32:826-830.