بررسی رشد و توسعه لارو اکینوکوکوس گرانولوزوس در موش سوری و هامستر

غلامعلی سبزواری نژاد ✦ دکتر عبدالحسین دلیمی ✦✦

یافته / سال پنجم / شماره ۱۸

چکیده

مقدمه: کیست هیداتید از بیماری های انگلی مشترک انسان، دام، گوشتخواران اهلی و وحشی می باشد. این بیماری در انسان موجب ضایعات و آسیبهای عضو شده و گاهی منجر به مرگ می شود .

هدف از انجام این مطالعه بررسی رشد کیست هیداتید ثانویه در حیوانات آزمایشگاهی، تعیین حساسیت آنها، تهیه مقاطع بافتی و چگونگی رشد و تشکیل مراحل کیست هیداتید ثانویه بود.

مواد و روشها : به منظور بررسی رشد کیست هیداتید ثانویه و تعیین حساسیت موش سوری و هامستر سفید، تعداد ۳۶ سر موش سوری و ۲۷ سر هامستر سفید ، با ترزیق داخل صفاقی لارو اکینوکوکوس گرانولوزوس گوسفندی مورد ارزیابی قرار گرفتند؛ سپس به مدت ۹ ماه ، ماهیانه تعداد معینی از حیوانات کالبدگشایی شده و محوطه صفاق ، کبد ، ریه ، کلیه و طحال از نظر آلودگی به کیست ، مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها : در این بررسی کیست هیداتید ثانویه در موش سوری از ماه سوم تشکیل گردید و در ماههای بعد بخصوص ماه هشتم و نهم در کلیه موشها کیست هیداتید به تعداد زیاد رشد کرد؛ بطوری که در دو سر از موشهایی که در ماه نهم کالبدگشایی شدند، تعداد ۸ و ۱۴ کیست در محوطه صفاقی آنان مشاهده گردید.

نتیجه گیری : کلیه کیست ها غیر بارور و استریل بوده و با افرایش مدت آلودگی بر تعداد موش های مثبت و تعداد کیست ها افزوده گردید. بررسی مقاطع بافتی ، دیواره کیست و واکنش سلولهای دفاعی را نشان داد. موش سوری حیوان مناسبی برای رشد کیست هیداتید ثانویه می باشد و از ماه سوم آلودگی کیستها قابل مشاهده است.

واژه های کلیدی: اکینوکوکوس گرانولوزوس ، موش سوری ، هامستر ، رشد

✦ مربی ـ عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی لرستان
✦✦ دانشیار ـ عضو هیئت علمی دانشگاه تربیت مدرس تهران

مقدمه

هیـداتیدوزیس[1] از بیماریهـای انگلی مشترک انسان ، دام، گوشتخواران اهلی و وحشی می باشد. بیماری در انسان موجب ضایعات و آسیب های عضو شده و گاهی منجر به مرگ می گردد. هیداتیدوزیس در حیوانات بخصوص دامها موجب زیانهای اقتصادی فراوان می شود (۱، ۲، ۳، ۴).

سگ میزبان اصلی بیماری، با دفع تخم انگل همراه با مدفوع در مزارع، سبب آلودگی آب، گیاهان و سبزیجات می شود. انسان در اثر تماس نزدیک با سگ و مصرف سبزیجات و نشخوارکنندگان با تغذیه از علوفه آلوده به تخم به بیماری مبتلا می گردند (۱، ۲، ۴) .

جنین تخم در روده آزاد شده و پس از عبور از دیواره روده در اعضای مختلف بدن انسان (کبد، ریه، طحال، مغز و غیره) جایگزین شده و به تدریج تشکیل کسیت هیداتید می نماید.

با توجـه به مشکلات اقتصـادی، اجتمـاعی و بهداشتـی کیست هیـداتید، لازم است تحقیقـات وسیع در زمینه های مختلف بیماری صورت گیرد. اکثر این مطالعات نیاز به محیط های مناسب این ویتـرو[2] و این ویـو[3] دارند که بتـوان تحقیقـات را ابتـدا در محیـط های آزمایشگاهی مناسب یا حیوان آزمایشگاهی انجام ونتایج آن را تعمیم و گسترش داد (۴،۵).

اکثـر محققـان در مناطق مختلف جهـان، مطالعـات وسیع و گسترده ای در مـورد رشد کیست هیداتید ثانویه انجام داده اند و نتایج متناقصی بدست آورده اند و تاکنون چنین مطالعه ای روی حیوانات آزمایشگاهی تولید کشور انجام نگرفته است. این مطالعه در پی آن است با تزریق پروتواسکولکس[4] کیست هیداتید اولیه گوسفندی به موش سوری و هامستر سفید، حساسیت آنان را مورد بررسی قرار دهد (۶،۷،۸) .

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی از موش سوری و هامستر سفید که سن آنان بین ۶ تا ۷ هفته و از جنس نر بودند، استفاده شده است .

کبد و ریه گوسفند آلوده به کیست هیداتید را از کشتارگاه جمع آوری کرده و بعد از ضد عفونی با الکل یده به محیط استریل هود انتقال داده و در شرایط استریل کیست ها را از کبد و ریه جدا نموده، و درظرف استریل قرار داده شد. زمانی که میزان پروتواسکولکس به حد مورد نظر رسید ،سه تا پنج بار با محلول نرمال سالین[5] استریل شستشو شدند؛ سپس محلول رویی را ریخته و روی آن محلول هانکس[6] حاوی پپسین۰/۵mg/mlبا PH= ۲ ریخته و به مدت ۴۰ تا ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده تا پروتواسکولکس ها، از لایه ژرمینال[7] و کیست های دختر جدا شوند و محلول خالص تری از پروتواسکولکس ایجاد شود؛ سپس سه تا پنج بار دیگر با محلول نرمال سالین استریل شستشو شدند.

با استفـاده از ائوزین[8] ۰/۱درصـد و تریپان بلو[9] ۰/۲۵ درصـد، زنده بودن پـروتواسکولکس ها را در زیر میکـروسکـوپ با بـزرگ نمایی ۱۰ مشاهده و با شمارش درصد پروتواسکولکس بدست آمد. برای اطمینان بیشتر فعالیت سلولهای شعله ای پروتواسکولکس های رنگ نگرفته در زیر میکروسکوپ مشاهده شد. به میزان ۰/۱ میلی لیتر از محلول پروتواسکولکس در محلول هموژن در ظرف پتری خط کشی و لام مکعبی ریخته شد و در زیر لوپ تعداد پروتواسکولکس در حجم مورد نظر شمارش گردید سپس با مشخص بودن حجم محلول هموژن و تعداد پروتواسکولکس در ۰/۱ میلی لیتر میزان تقریبی، کل پروتواسکولکس در حجم محلول هموژن تعیین شده و با توجه به تعداد پروتواسکولکس تزریقی برای حیوانات حجم مشخصی از محلول به صورت داخلی صفاقی به حیوان تزریق شده و به سوسپانسیون، صد واحد پنی سیلین و ۲۰۰ میکروگرم استرپتوماسین در میلی لیتر اضافه شد (۶،۷).

1. Hyddatidosis 2. Invitro 3. Invivo
4. Protoscolex 5. Normal saline 6. Hanks solution
7. Germinal layer 8. Eosin 9. Trypan blue

بعد از شمارش، به هر سر موش سوری استرین NMRI حدود ۱۰۰۰ پروتواسکولکس، به هر سر هامستر سفید حدود ۱۰۰۰۰ پروتواسکولکس به طریق داخل صفاقی تزریق گردید.

هر ماه تعداد مشخص از موش سوری و هامستر سفید کالبدگشایی و محوطه صفاقی، کبد ، طحال ، کلیه و ریه آنها را از لحاظ آلودگی به کیست هیداتید ثانویه مورد بررسی ماکروسکوپی ، میکروسکوپی قرار می گرفت و در صورت تشکیل کیست هیداتید ثانویه ، جهت تهیه مقاطع بافتی، آن را در محلول ثبوت نگاهداری نموده و از اعضایی که در آن کیست، تشکیل شده مقاطع بافتی تهیه شده ، و با هماتوکسیلن،ائوزین[1] و پاس[2] رنگ آمیزی گردید. داده ها با استفاده از آزمون مجذور کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته ها

الف ـ موش سوری

در ماههای اول و دوم کالبدگشایی موش سوری و بررسی محوطه شکمی و احشاء ، نقاط فیبروزی در قسمتهای مختلف محوطه شکمی مشاهده شد.رشد کیست هیداتید ثانویه در موش سوری از ماه سوم آلودگی قابل رویت بود که در دو سر از موشها کیست هیداتید ثانویه تشکیل گردید که قطر بزرگترین کیست ۴/۳۲×۲/۷۲ میلی متر بود. در ماه چهارم آلودگی دو سر از موشها دارای چندین کیست چسبیده به پرده دیافراگم و آزاد در محوطه شکمی بودند که قطر بزرگترین کیست ۳/۸×۴/۳۸ میلی متر بود. به همین ترتیب ماههای بعدی در تعدادی از موشها کیست هیداتید ثانویه رشد کرده؛ بطوریکه در محوطه شکمی دو سر از موشهایی که در ماه نهم آلودگی کالبدگشایی شدند ،تعداد ۸ و ۱۴ کیست هیداتید ثانویه در محوطه شکمی آنان تشکیل شده بود. کلیه کیست ها استریل و غیر بارور بودند (جدول ۱و عکسهای ۱ تا ۲) .

ب ـ هامستر سفید :

در ماههای اول ، دوم وسوم کالبدگشایی و بررسی محوطه صفاقی و اعضای شکمی ، نقاط فیبروزی و اجسام کپسول شده حاوی پروتواسکولکس مرده چسبیده به اعضاء مختلف بخصوص سطوح روده ها و چین های صفاقی ، وجود دانه هایی روی پرده دیافراگم، بزرگی طحال، تورم مجرا و غدد لنفاوی مشاهده شده، که از ماه چهارم به بعد از شدت ضایعات کاسته شده؛ بطوریکه از ماه ششم محوطه صفاقی عاری از هر گونه ضایعه بود .

ج ـ بررسی مقاطع بافتی

پس از تهیه مقاطع بافتی از بافت هایی که کیست هیداتید ثانویه تشکیل شده بود و رنگ آمیزی با هماتوکسیلن، ائوزین و پاس، بوسیله میکروسکوپ ساختمان کیست و واکنش دفاعی سلولی بافت آلوده مورد بررسی قرار گرفت. بطوریکه در رنگ آمیزی با هماتوکسیلن و ائوزین واکنشهای سلولهای دفاعی، آماسی، ماکروفازها، سلولهای جیانت نعل اسبی[3]، لایه فیبروز و دیواره کیست قابل تشخیص است. با رنگ آمیزی اختصاصی پاس حفره کیست، غشا کیست از بافت کبد قابل تشخیص بود (عکس های ۳-۳ تا ۳-۴).

جدول ۱: نتایج رشد کیست هیداتید ثانویه در موش سوری با تزریق داخل صفاقی پروتواسکولکس اکینوکوکوس گرانولوزوس گوسفندی

استرین حیوان (تعداد)	میزان ترزیقی	تعداد حیوان آلوده شده	مدت زمان آلودگی (ماه)	نتیجه کالبدگشایی تعداد مثبت	نتیجه کالبدگشایی تعداد منفی
موش سوری استرین NMRI (۳۶)	۱۰۰۰۰	۴	۱	-	۴
		۴	۲	-	۴
		۴	۳	۲	۲
		۴	۴	۲	۲
		۴	۵	۲	۲
		۴	۶	۱	۲
		۴	۷	۳	-
		۴	۸	۴	-
		۴	۹	۴	-
جمع				(۵۲/۹)۱۸	(۴۷/۱)۱۶

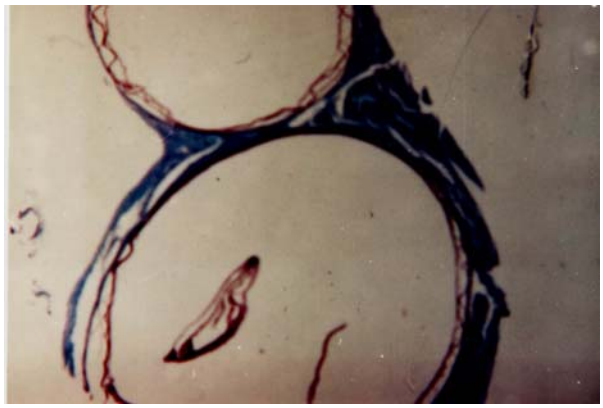
1. Hematoxylin and Eosin
2. Periodic Acid Shift (PAS)
3. Giant cell



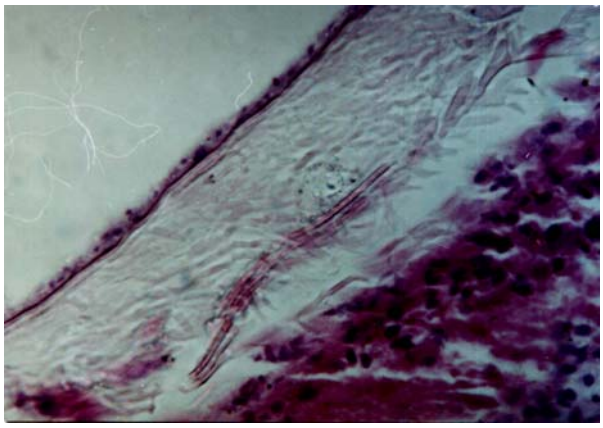
عکس (۱) کیست هیداتید ثانویه دربافت کبد موش سوری ، ماه پنجم آلودگی .



عکس (۲) کیست هیداتید در محوطه شکمی موش سوری (۱۴ کیست) ماه نهم آلودگی .



عکس (۳) دیوار کیست هیداتید ثانویه (قهوه ای)،بافت کبد موش سوری (آبی) رنگ آمیزی پاس، ۱۲×



عکس (۴) دیواره کیست هیداتید ثانویه (کهربایی) بافت کبد(قرمز) موش سوری،رنگ آمیزی(H&E) ۴۰۰×

بحث

اکثر محققان برای بررسی رشد کیست هیداتید در حیوانات آزمایشگاهی، از پروتواسکولکس که کم خطر می باشد، استفاده نمودند. د و[1] (۱۹۳۵)، دکومان[2] (۱۹۳۸)، کوت لن[3]، لوکارت[4] و کوچت[5] (۱۹۳۵)، موش سفید را باپروتواسکولکس کیست هیداتید گوسفندی به طریق داخل صفاتی آلوده نمودند و اظهار داشتند که موش سفید حیوان واسط مناسبی برای ایجاد کیست هیداتید ثانویه است (۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱).

اسکینازی[6] و کلی چائن[7] (۱۹۵۹)، شرح دادند: رشد کیست هیداتید ثانویه در موش سفید از ۳تا ۱۴۰روز پس از آلودگی ایجاد می شود که کیست ها کوچک و غیر بارو هستند (۶،۱۰،۱۲).

سینگ[8] (۱۹۷۶)، از پروتواسکولکس گوسفندی و رائو[9] (۱۹۸۵)، از پروتواسکولکس گاوی در موش تزریق کردند که نتیجه مثبت بود (۸،۹). هیت[10] (۱۹۷۰)، با استفاده از پروتواسکولکس کیست اولیه کبد و ریه گوسفند استرالیایی و ترزیق داخل صفاتی به استرین های مختلف موش سوری نتیجه می گیرد که موش سوری حیوان مناسبی برای ایجاد کیست هیداتید ثانویه می باشد (۶).

1. Deve
2. De Cooman
3. Coutelen
4. Locroart
5 .Cochet
6. Schinazzi
7. Kieljian
8. Singh
9. Rao
10. Heath

در بررسی حاضر در ماه سوم آلودگی ، کیست هیداتید ثانویه با خصوصیات کامل کیست هیداتید در حاشیه کبد تشکیل شده است و به همین صورت در ماههای بعدی بخصوص ماه نهم علاوه براینکه کلیه موشها کالبدگشایی در این ماه مثبت بودند در دو سر از آنان هشت و چهارده کیست درمحوطه شکمی ، مشاهده گردید (عکس ۲ و جدول ۱).

اکثر محققان با استفاده از پروتواسکولکس کیست اولیه حیوانات از جمله گوسفند، اسب، بوفالو و تزریق پروتواسکولکس به روشهای مختلف در هامستر انجام داده اند، نتایج منفی بدست آورده اند. فون تانا[1]، ساینز[2] و اسکاجلیا[3] (۱۹۶۳)، با استفاده از پروتواسکولکس کیست هیداتید اولیه قادر به ایجاد کیست هیداتید ثانویه در هامستر نشدند (۶، ۱۶).

تامپسون[4] و همکاران (۱۹۷۰) ،در تحقیق خود با تزریق ۸۰۰۰ پروتواسکولکس کیست اسبی به روش داخل صفاقی به گونه های مختلف هامستر گزارش نمودند که کیست هیداتید ثانویه ایجاد نشد (۱۱).

با توجه به نتایج این مطالعه می توان گفت :

ـ موش سوری حیوان مناسبی برای رشد کیست هیداتید ثانویه با استفاده از تزریق داخل صفاتی لارو اکینوکوکوس گرانولوزوس گوسفند ایرانی می باشد؛

ـ رشد کیست هیداتید ثانویه در موش سوری از ماه سوم قابل مشاهده بوده و ساختمان کامل کیست هیداتید را دارا می باشند،

ـ کلیه کیست های هیداتید ثانویه ایجاد شده غیر باور و فاقد پروتواسکولکس بودند؛

ـ هامستر، حیوان مناسبی برای ایجاد کیست هیداتید ثانویه با تزریق داخل صفاتی کیست هیداتید گوسفند ایرانی نمی باشد؛

ـ برای ایجاد کیست هیدانید ثانویه در مدت زمان کوتاه، موش سوری حیوان مناسبی می باشد.

References

۱ـ اسلامی، ع. کرم شناسی دامپزشکی ، جلد دوم ،تهران: موسسه انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۰

۲ـ موبدی، ا؛ دلیمی، ع.ا. اپیدمیولوژی کیست هیداتید در جهان و ایران، چاپ اول، تهران: انتشارات مقدم، ۱۳۷۳

3. Marqurdt WC. Parasitology vector Biology, 2th Ed, U.S.A, Academic Press, 2000
4. Gillespie SH., Pearson RD. Clinical Parasitology. England, Gohn Wiley & Sons LTD, 2001
5. Garsia LS. Diagnostic Medical Parasitology. Fourth Ed, Washington, DC. ASM Press, 2001
6. Heath, D.D. "The development of Echinococcus granulosus larve in laboratory animals," Parasitology, 1970; Vol. 60, PP. 449-456
7. Rycke D, Decooman P. "Experimental infection of mice With Echinococcus Equinus of British origin", Ann Trop med and parasitol, 1980; 74(1): 97-99
8. Schwabe, CW and Schinazi LA, Araxie K. "Host Parasite reliationships in Echinococcosis II Age resistance to secondary Echinococcosis in the white mouse," Am J Trop Med Hyg, 1959; Vol. 8, pp: 29-36
9. Smyth J.D. "Studies on tape Worm physiology", parasitology 1962; Vol. 52, PP. 441-451
10. Smyth, J.D. and M.M, Smyth. "natural and experimenteal of Echinococcus granulosus and E . Multilocularis With On the genetics of speciation in the genus Echinococcus". Parasitology . 1964; Vol. 54. PP. 493-544

1. Fontana 2. Saenz 3. Scaglia
4. Tampson

11. Thompson, R.C.A. “The Mongolian Gerbil (Meriones unguiculatus) as a laboratory host for the cystic stage of Echinococcus granulosus of British horse origin,” Int J parasitol, 1976; Vol.6, PP.505-511
12. Schwabe, C.W. “Larval Echinococcus infection in laboratory animals”, Bull WHO. 1968; Vol. 39.pp. 126-127
13. Kumaratilake. L.M. and R. C. A. Thompson. “A comparison of Echinococcus granulosus from different geographical areas of Australia using Secondary cyst development in mice”, Int J parasitol, 1983; Vol. 13, No.5, PP 509-515
14. Reddy, C.R.R.M. and G, Suvarnakumart. “Biology of Echinococcus granulosus as it occursin suth India”. Acta Trop Parasitology , 1971; No. 28(4), PP. 311-322
15. Pauluzzi, S. “Serologic response of Mice and rats to secondary Experimental Hydatid Disease”, Am J Trop Med and Hyg. 1968; Vol . 18 .No. 1,PP.7_12
16. Yamashita, J. “Development of Echinococcus in laboratory animal,” Bull WHO, 1968; Vol . 39 , PP. 127-129