

## بررسی اثر کشندگی عصاره باکتری‌های جدا شده از کیست هیداتیک عفونی بر پروتواسکولکس در شرایط آزمایشگاهی

محمد سرداری<sup>۱</sup>، امیرحسین مقصود<sup>۲</sup>، محمد یوسف علیخانی<sup>۳</sup>، محمد فلاح<sup>۴\*</sup>

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد انگل شناسی، سازمان تأمین اجتماعی بروجرد، بیمارستان کوثر، بروجرد، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

<sup>۳</sup> استاد گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

<sup>۴</sup> استاد گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

\* نویسنده مسئول: محمد فلاح، استاد گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران. ایمیل: Fallah@umsha.ac.ir

DOI: 10.21859/hums-23044

### چکیده

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۵/۱۳

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۹/۲۸

### واژگان کلیدی:

اسکولکس کش

پروتواسکولکس

سونیکیشن

عصاره باکتریایی

کیست هیداتید

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

مقدمه: درمان انتخابی کیست هیداتیک جراحی می‌باشد. با توجه به خطر نشت پروتواسکولکس‌ها به داخل احشاء و ایجاد کیست‌های ثانویه، جهت پیشگیری از این خطر مواد اسکولکس کش مختلفی به داخل کیست تزریق می‌شود که عوارض جانبی گوناگونی در میزبان ایجاد می‌کند. بهمین منظور در این مطالعه اثر اسکولکس کشی عصاره باکتری‌های جدا شده از کیست هیداتیک عفونی شده مورد بررسی قرار گرفت.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی از کیست هیداتیک گوسفند با روشهای استاندارد باکتری شناسی به جدا سازی و شناسایی باکتری‌های آلوده کننده تا سطح جنس و گونه اقدام شد. از این باکتری‌ها با سونیکاسیون عصاره تام باکتریایی تهیه و با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل رقت‌های متوالی ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۸، ۱/۴، ۱/۲، ۱/۱ و ۱/۶۴ تهیه و لاروهای زنده در زمان‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه در رقت‌های فوق قرار داده شد. میانگین درصد پروتواسکولکس‌های مرده با رنگ آمیزی حیاتی ائوزین و به کمک میکروسکپ نوری تعیین گردید.

**یافته‌ها:** پنج نوع باکتری از کیست‌های عفونی شده جدا شد که شامل استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، اشریشیا کلی، پروتئوس میرابیلیس و سودومونا آئروژینوزا بود. عصاره هیچ یک از باکتری‌های جدا شده از کیست هیداتیک در زمان‌های تماس مذکور تأثیر قابل قبولی بر پروتواسکولکس‌ها نداشتند. به عنوان نمونه عصاره تام سودوموناس آئروژینوزا پس از ۶۰ دقیقه حداکثر ۱۳/۱۷٪ از اسکولکس‌ها را از بین برد.

**نتیجه گیری:** نتایج حاکی از تأثیر اندک عصاره باکتری‌های جدا شده از کیست هیداتیک بر روی پروتواسکولکس‌ها بود. مرگ اسکولکس‌ها در کیست‌های عفونی شده می‌تواند ناشی از مجموعه عوامل دیگری بجز تأثیر مستقیم عصاره باکتری‌ها باشد.

### مقدمه

دامپروری رایج است. آلودگی میزبانهای نهایی مثل سگ، گاو، شغال و روباه و گاهی ایجاد کیست‌های ثانویه در میزبان واسط توسط مرحله لاروی یا پروتواسکولکس موجود در داخل کیست هیداتیک صورت می‌گیرد. از لحاظ جغرافیایی میزان شیوع کیست هیداتیک در انسان به عواملی مانند شرایط بهداشتی و ژنوتیپ انگل بستگی دارد. بیماری بیشتر در کشورهای مدیترانه، شمال چین، آفریقا و آمریکای جنوبی انتشار دارد [۳].

در مواردی کیست‌ها ممکن است به علت نفوذ برخی باکتری‌ها به درون مایع هیداتیک و ایجاد عفونت ثانویه باکتریایی عقیم شوند یعنی پروتواسکولکس تولید نکنند یا پروتواسکولکس‌های موجود دژنره شده از بین بروند که تدریجاً محتویات کیست چرکی، پنیری شکل و نهایتاً آهکی می‌شود [۴].

کیست هیداتیک یا هیداتیدوز، بیماری زئونوز مهم ایجاد شده توسط انگل اکینووکوکوس گرانولوزوس می‌باشد که در میزبانهای واسط مثل گوسفند، بز، گاو، شتر و علفخواران اهلی و وحشی و همچنین انسان ایجاد می‌گردد [۱]. عفونت در میزبان واسط، بجز برای تعداد کمی از موارد ابتلا به عفونت‌های شدید یا درگیری اندامهای حساس مثل مغز و قلب، معمولاً تا مدت‌های طولانی بدون علامت است [۲]. در انسان و دام باعث زبانه‌های بهداشتی و اقتصادی زیادی در سراسر جهان می‌شود و شناخت و مطالعه دقیق آن جهت جلوگیری از این ضررها، ضرورت جدی دارد. آلودگی به مرحله لاروی انگل از زمانهای قدیم شناخته شده است و بالاترین میزان بروز در مناطقی است که

داده شدند. ابتدا سطح آنها با الکل ۷۰ درجه ضد عفونی شده و با یک سرنگ استریل مایع کیست آسپیره شده و سپس یک قطره از مایع کیست روی محیط بلاد آگار ۵٪ (با خون دفیبرینه گوسفندی) برای جدا کردن باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی هوازی بی هوازی اختیاری و یک قطره از مایع کیست روی محیط ائوزین متیلن بلو برای جدا کردن باکتری‌های گرم منفی هوازی بی هوازی اختیاری به روش استریک کردن، کشت داده شدند. برای تعیین هویت باکتری‌ها، پس از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت از کشت مایع کیست، در صورت مشاهده کلنی باکتری‌ها در روی محیط کشت، با روش‌های استاندارد میکرب شناسی، باکتری‌های جدا شده تا سطح جنس و گونه شناسایی شدند [۱۴].

### تهیه عصاره باکتری‌ها

از هر یک باکتری‌های خالص به میزان مورد نیاز رقت‌های نیم مک فارلند در سرم فیزیولوژی استریل در حجم‌های ۵۰ میلی لیتری در ظروف استریل تهیه و این ظروف به مدت یک ساعت در روی یخ قرار داده شده و سپس با استفاده از دستگاه سونیکاتور Hielscher, UP200 با Cycle 1, 100 Amplitude, 1 دوبار هر بار به مدت ۵ دقیقه سونیکه شد. از عصاره سونیکه شده حاصل رقت‌های ۱/۱، ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲ و ۱/۴۶ با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل رقت‌های متوالی تهیه و تا زمان استفاده دردمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

### روش تعیین زنده بودن پروتواسکولکس‌ها

کل مایع هیداتیک در شرایط استریل با سرنگ آسپیره و در لوله‌های استریل فالکون ریخته شد. همه لوله‌های محتوی مایع هیداتیک به مدت نیم ساعت به حالت ساکن کنار گذاشته شدند تا تمامی پروتواسکولکس‌ها، رسوب کنند و سپس مایع رویی آنها دور ریخته شد. در نهایت پروتواسکولکس‌های ته نشین شده، سه مرتبه با نرمال سالین استریل، شستشو داده شد. به این صورت که با ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ ثانیه سانتریفوژ، مایع رویی دور ریخته شده و این کار حداقل سه بار تکرار شد. یک قطره از مایع هیداتیک حاوی پروتواسکولکس‌ها روی لام قرار داده شده و پس از مخلوط کردن آن با یک قطره از رنگ ائوزین ۰/۱٪ در زیر میکروسکوپ بررسی و در صورت رنگ نگرفتن پروتواسکولکس‌ها، زنده بودن آنها مشخص شد. نمونه‌هایی از کیست‌ها در صورت داشتن لاروهایی با زیست پذیری بیش از ۹۰٪، جهت مطالعه انتخاب شدند.

هیداتیدوزیس ثانویه، عمدتاً در حفره شکمی بطور خودبخودی یا در اثر تروما (مثلاً در اثر نشت حین جراحی) که باعث پارگی کیست و انتشار پروتواسکولکس‌ها می‌شود، ایجاد می‌گردد [۴]. مطمئن‌ترین راه درمان کیست هیداتیک، جراحی است. یکی از عوارض این روش خطر نشت محتویات کیست در خلال جراحی و عود بیماری (هیداتیدوز ثانویه) بعد از عمل جراحی است که می‌تواند بسیار خطرناک و مرگ بار باشد [۵]. این عارضه را می‌توان با بکار بردن تکنیک‌های جراحی متفاوت و تزریق مواد اسکولکس کش مختلف به داخل کیست مثل سالین هایپر تونیک [۷]، نیترات نقره [۸]، مانیتول ۲۰٪ [۹]، پرازیکوانتل، فرمالین ۱٪، و پوویدون آبوداین بطور موضعی بعد از آسپیره کردن مایع کیست و یا انجماد و الکترولیز با برق با ولتاژ کم کنترل کرد.

اگر چه مطالعاتی در مورد ایزوله کردن باکتری‌های موجود در کیست هیداتیک و اثرات اسکولکس کشی سالین هایپر تونیک، نیترات نقره ۵٪، الکل اتیلیک ۹۵٪، آب اکسیژنه و بتادین، آلبندازول [۱۰]، کلر هگزیدین گلوکونات [۱۱]، ستریماید [۱۲] و عصاره‌های مختلف گیاهی انجام شده است [۱۳] (بسیاری از این عوامل اسکولکس کش ممکن است سبب عوارض نامطلوبی بر روی بافت زنده میزبان مانند نکروز سلول‌های کبدی گردند که کاربردشان را محدود می‌کند). لیکن مطالعه‌ای با این روش موجود تاکنون صورت نگرفته است. بنابراین، این مطالعه با هدف تعیین اثر کشندگی عصاره باکتری‌های جدا شده از کیست هیداتیک بر روی پروتواسکولکس‌های زنده انجام گرفت تا در صورت مشاهده نتایج مطلوب ضمن مشخص شدن علت عقیم شدن کیست در کیست‌های بارور، از آن برای استفاده قبل از جراحی کیست توصیه شود.

### روش کار

برای انجام این مطالعه، تجربی-آزمایشگاهی کیست‌های هیداتیک از کشتارگاه صنعتی بروجرد جمع آوری و با آسپیره کردن مایع هیداتیک در شرایط استریل کیست‌های بارور شناسایی و از پروتواسکولکس‌های زنده استفاده شد. به دلیل باروری بیشتر کیست‌های گوسفندی ترجیحاً از کیست‌های این حیوان استفاده گردید و با بررسی کیست‌های عفونی شده، به جدا سازی و شناسایی باکتری‌های عفونی کننده کیست‌های هیداتیک اقدام شد.

### روش جداسازی و شناسایی باکتری‌ها

کدهای حاوی کیست‌های بزرگ توسط سرم فیزیولوژی استریل شسته شده و به محیط استریل هود کلاس دو انتقال

## بررسی تأثیر عصاره بر پروتواسکولکس های

## زنده

بررسی، آزمایش سه بار تکرار گردید و میانگین درصد لاروهای مرده مربوط به هر رقت از عصاره باکتری مورد نظر و زمان مربوطه به عنوان نتیجه ثبت شدند. میزان پروتواسکولکس های مرده در رقت های مختلف و زمانهای مختلف با آزمون آنالیز واریانس مورد بررسی آماری قرار گرفتند.

## یافته ها

باکتری های جدا شده شامل: اشیشیا کلی، استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک ساپروفیتیکوس، پروتئوس میرابیلیس و سودوموناس آئروژینوزا بودند. بیشترین درصد پروتواسکولکس مرده در رقت ۱/۱ عصاره (۱۳/۱۷٪) در رقت ۱/۲ عصاره (۱۲/۱۷٪) در رقت ۱/۴ عصاره (۱۲٪) در رقت ۱/۸ عصاره (۱۱/۹٪) در رقت ۱/۱۶ عصاره (۱۱/۸٪) در رقت ۱/۳۲ عصاره (۱۱/۶٪) و در رقت ۱/۶۴ عصاره (۱۰/۹٪) پس از گذشت ۶۰ دقیقه از زمان تماس، مربوط به باکتری سودوموناس آئروژینوزا مشاهده گردید و در سایر باکتری ها عصاره تأثیر چندانی نداشت (جدول ۱).

به هر دو میلی لیتر از غلظت های تهیه شده در یک لوله آزمایش استریل یک قطره از سوسپانسیون پروتواسکولکس که حداقل دارای ۱۰۰۰ لارو زنده بود اضافه شد و به آرامی مخلوط شد. در مدت زمانهای پنج، ده، بیست، چهل و شصت دقیقه پروتواسکولکس های مجاور شده با عصاره مورد بررسی قرار گرفتند. به این صورت که بعد از اتمام زمان مواجهه مورد نظر، مایع رویی خارج و به رسوب حاصل ۲ میلی لیتر رنگ ائوزین ۰/۱٪ اضافه گردید. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، مایع رویی خارج و در پایان پروتواسکولکس ها از نظر حیات و یا عدم حیات با رنگ ائوزین بررسی و درصد آنها تعیین شد. برای کنترل و بررسی عوامل مؤثر بر حیات پروتواسکولکس ها از جمله زمان، بطور موازی پروتواسکولکس ها را در لوله آزمایش دیگری (شاهد) با سرم فیزیولوژی استریل مجاور کرده و درصد زنده بودن آنها پس از گذشت زمان مشابه گروه تست ثبت شد. برای هر رقت و زمان مورد

جدول ۱: میانگین درصد پروتواسکولکس های مرده در گروه شاهد و تست در زمان های مورد بررسی در رقت ۱/۱ عصاره باکتری ها

۵ دقیقه	۱۰ دقیقه	۲۰ دقیقه	۴۰ دقیقه	۶۰ دقیقه
<b>اشیشیا کلی</b>				
شاهد	۶/۵	۷/۹۵	۸	۱۱
تست	۶/۹	۹/۴۷	۱۰	۱۱/۷۷
P	۰/۷۲۱	۰/۱۳۷	۰/۱۱۸	۰/۵۷۴
<b>استافیلوکوک اورئوس</b>				
شاهد	۲/۳	۲/۳۳	۴/۷۰	۷/۶۰
تست	۵	۵/۱۷	۶/۶۷	۸/۳۳
P	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۵۴	۰/۸۰۶
<b>استافیلوکوک ساپروفیتیکوس</b>				
شاهد	۸	۹/۴	۹/۷۰	۱۰/۱۷
تست	۹	۱۰/۲	۱۰/۷۰	۱۱/۸۶
P	۰/۴۲۳	۰/۵۴۷	۰/۴۶۰	۰/۲۲۵
<b>پروتئوس میرابیلیس</b>				
شاهد	۴/۵	۴/۸۳	۶	۱۱/۳۳
تست	۶/۵	۸/۱۷	۱۰/۵	۱۲/۸۶
P	۰/۰۵۰	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰	۰/۲۷۳
<b>سودوموناس آئروژینوزا</b>				
شاهد	۸/۲	۸/۶	۹/۲	۱۰/۱۷
تست	۹	۹/۳	۱۱	۱۳/۱۷
P	۰/۵۲۴	۰/۵۸۴	۰/۴۲۱	۰/۰۳۸

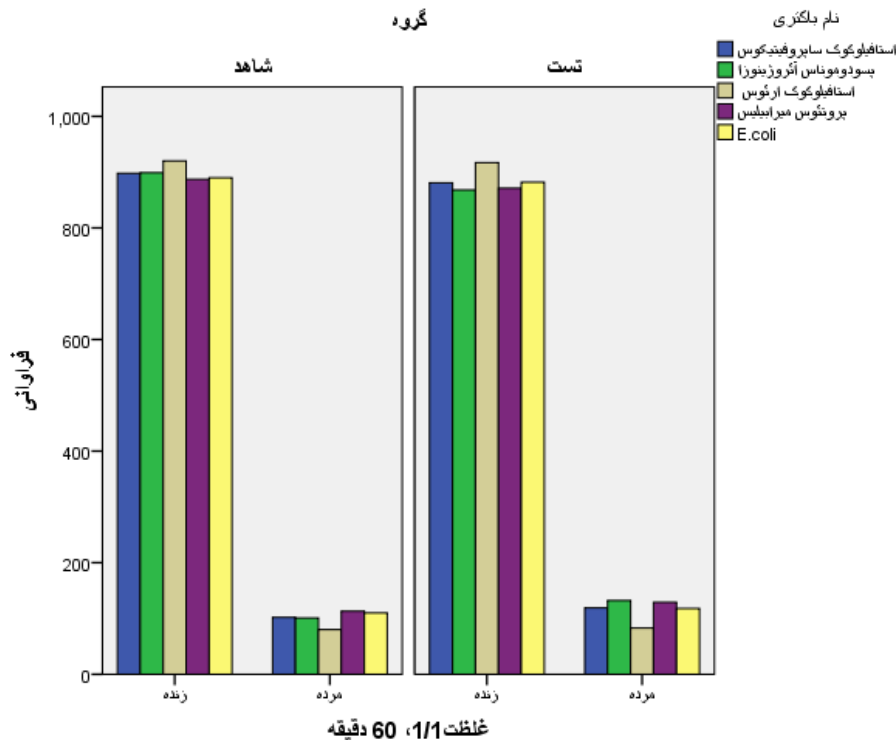
در باکتری اشریشیا کلی در رقت ۱/۱ با گذشت زمان تفاوت معناداری بین میانگین درصد پروتواسکولکس های مرده گروه شاهد و گروه تست دیده نشد ( $P > 0/05$ ). در صورتی که در باکتری استافیلوکوک اورئوس در رقت ۱/۱ در زمان ۵ دقیقه و ۱۰ دقیقه بین گروه های شاهد و تست تفاوت معناداری در میانگین درصد پروتواسکولکس های مرده وجود داشت ( $P = 0/001$  و  $P < 0/001$ ) و در زمان های دیگر تفاوت معناداری دیده نشد. در باکتری استافیلوکوک ساپروفیتیکوس در رقت ۱/۱ در هیچ کدام از زمان های مورد بررسی تفاوت معناداری بین میانگین درصد پروتواسکولکس های مرده در دو گروه شاهد و تست دیده نشد اما در باکتری پروتئوس میرابیلیس در رقت ۱/۱ در زمان های ۵ دقیقه و ۱۰ دقیقه و ۲۰ دقیقه و ۴۰ دقیقه در میزان میانگین درصد پروتواسکولکس های مرده در بین دو گروه تفاوت دیده شد ( $P = 0/05$  و  $P = 0/000$  و  $P = 0/012$ ) و در ۶۰ دقیقه تفاوتی

دیده نشد. در باکتری پسودوموناس آئروژینوزا دو گروه در ۶۰ دقیقه در میانگین درصد پروتواسکولکس های مرده تفاوت داشتند ( $P = 0/038$ ). در بقیه رقت های عصاره ها با توجه به رقیق شدن عصاره میزان پروتواسکولکس کشی عصاره کاهش یافت به طوری که در باکتری سودوموناس آئروژینوزا در رقت ۱/۲ عصاره ۱۲/۱۷% از پروتواسکولکس ها را از بین برد و در رقت های ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲ و ۱/۶۴ در این باکتری باعث مرگ ۱۲، ۸/۹، ۶/۱۱، ۱۱/۱۱ و ۱۰/۹% پروتواسکولکس ها به ترتیب شده بود

با توجه به تصویر ۱ بیشترین میزان پروتواسکولکس های مرده در سودوموناس آئروژینوزا ۱۰/۱۷ در گروه شاهد و ۱۳/۱۷ در گروه تست و همچنین پروتئوس میرابیلیس ۱۱/۳۳% در گروه شاهد و ۱۲/۸۶% در گروه تست را داشتند و کمترین میزان پروتواسکولکس مرده در استافیلوکوک اورئوس ۸% در گروه شاهد و ۸/۸۳% در گروه تست بود.

جدول ۲: میانگین درصد پروتواسکولکس های مرده در گروه شاهد و تست در زمان های مورد بررسی در رقت ۱/۶۴ عصاره باکتری ها

۵ دقیقه	۱۰ دقیقه	۲۰ دقیقه	۴۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	
<b>اشریشیا کلی</b>					
شاهد	۵/۷۰	۶/۱۰	۶/۲۰	۶/۴۰	۶/۵۰
تست	۶/۳۰	۶/۴۰	۶/۶۰	۶/۷۰	۶/۸۰
P	۰/۵۷۲	۰/۷۸۲	۰/۷۱۵	۰/۷۸۶	۰/۷۸۸
<b>استافیلوکوک اورئوس</b>					
شاهد	۵/۲۰	۵/۳۰	۵/۴۰	۵/۷۰	۶/۰۰
تست	۵/۷۰	۵/۸۰	۶	۶/۱۰	۶/۵۰
P	۰/۶۲۲	۰/۶۲۵	۰/۵۶۳	۰/۷۰۴	۰/۶۴۴
<b>استافیلوکوک ساپروفیتیکوس</b>					
شاهد	۶/۹۰	۷/۵۰	۸/۰۰	۸/۵۰	۹/۰۰
تست	۷/۵۰	۸/۲۰	۹/۰۰	۹/۵۰	۱۰/۱۰
P	۰/۶۰۴	۰/۵۶۱	۰/۴۲۳	۰/۴۳۵	۰/۴۰۳
<b>پروتئوس میرابیلیس</b>					
شاهد	۴/۸۴	۵/۰۳	۵/۲۷	۵/۴۰	۵/۹۵
تست	۵/۱۰	۵/۱۲	۵/۳۷	۵/۶۲	۷/۰۰
P	۰/۷۵۷	۰/۹۱۹	۰/۹۲۱	۰/۸۴۵	۰/۳۶۵
<b>پسودوموناس آئروژینوزا</b>					
شاهد	۶/۰۰	۷/۰۰	۸/۶	۹/۵۰	۱۰/۰۰
تست	۸/۲۰	۹/۱۰	۱۰/۲۰	۱۰/۷۰	۱۰/۹۰
P	۰/۰۵۵	۰/۱۰۱	۰/۱۴۶	۰/۱۸۶	۰/۱۴۶



تصویر ۱: میانگین درصد تعداد پروتواسکولکس های مرده بر اثر رقت ۱/۱ عصاره انواع باکتری‌ها در ۶۰ دقیقه اول

## بحث

با مکانیسم‌هایی و احتمالاً با موادی پروتواسکولکس‌ها را از بین می‌برند. لذا باید روشن شود که این مکانیسم‌ها چیست یا آن مواد کدام است. از این رو در مطالعات بعدی بررسی اثر سیستم‌های آنزیمی باکتری‌ها در این زمینه می‌تواند مفید باشد.

با توجه به انتشار جهانی هیداتیدوز و ایجاد آلودگی در اعضاء حساس بدن انسان و با وجود اثرات محدود داروهای موجود بر روی این بیماری تا سالهای اخیر جراحی تنها درمان کیست هیداتید بود [۱۶]. اما امروزه فقط برای کیست‌های پیچیده مانند فیستول‌های صفراوی، پارگی در پریتون و... جراحی صورت می‌گیرد [۱۷، ۱۸]. مواد مختلفی هم به عنوان درمان دارویی و هم برای بی‌خطر نمودن جراحی از نظر نشت لارو استفاده شده که اغلب کم‌اثر و دارای عوارض سوء جانبی بوده‌اند. استفاده از مواد شیمیایی برای از بین بردن پروتواسکولکس‌ها در حین جراحی کیست هیداتیک اغلب منجر به ایجاد عوارض سوء جانبی در بافت‌هایی مثل کبد که کیست‌ها اغلب در آن مستقر هستند، می‌شود و عواقب وخیمی برای بیمار می‌تواند در بر داشته باشد. در نتیجه محدود کردن استفاده از این داروها و استفاده از مواد جدید مثل عصاره‌های باکتریایی و گیاهی به عنوان منابع جایگزین که ضمن اثر اسکولکس‌کشی قابل قبول، عوارض سوء

مطالعه حاضر فعالیت پایین اسکولکس‌کشی عصاره باکتری‌های جدا شده از کیست هیداتیک را نشان داد. به نظر می‌رسد با توجه به اینکه پس از نفوذ باکتری زنده به درون کیست و تکثیر آنها، به سرعت پروتواسکولکس‌ها از بین رفته و از اجساد آنها و سایر یاخته‌های نابود شده مایع هیداتیک عفونی شده و در ادامه کاملاً چرکی و پنیتری و نهایتاً کلسیفیه می‌شود؛ احتمالاً عاملی که منجر به مرگ پروتواسکولکس‌ها می‌شود تهاجم مستقیم باکتری به پروتواسکولکس باشد. یا ممکن است احیاناً موادی باشد که زمانی که انگل زنده است توسط آن تولید و باعث محافظت و زنده ماندن لارو می‌شود و با مرگ آنها این مواد که ممکن است مثلاً نوعی آنزیم باشد، تولید نمی‌گردد. این موضوع در مورد کرم‌های ساکن روده تأیید شده که سیستم آنزیمی موجود انگل ساکن روده، زمانی که زنده است مانع از تأثیر آنزیم‌های گوارشی روده بر روی آن شده و از هضم آن جلوگیری می‌کند. اثر کشندگی باکتری زنده بر پروتواسکولکس در مطالعه قبلی فلاح و همکاران [۱۵] نیز تأیید شده است که مواجهه مستقیم باکتری‌های زنده جدا شده از مایع کیست هیداتیک با پروتواسکولکس‌های زنده در زمان کوتاهی آنها را از بین می‌برد. بنابراین، تئوری فوق تا حدودی تأیید می‌شود که باکتری‌های زنده و کامل

بعد از شستشوی صفاقی برای جلوگیری از هیدراتیدوزیس ثانویه واسیدوز متابولیک و مت هموگلوبینمی در دو مورد گزارش شده است که از عوارض ستریماید می باشد. در واقع عوارض جانبی حاصله از هر کدام از این مواد، استفاده از آنها را محدود ساخته است [۳۱، ۳۲].

در واقع یک اسکولیسیدال ایده آل بایستی سریعاً تأثیر گذاشته و بتواند تمام پروتواسکولکس ها را از بین ببرد. و از طرفی عوارض جانبی سیستمیک و موضعی کمی داشته باشد ولی اکثر موادی که به عنوان اسکولیسیدال استفاده می شود بعضاً اثرات کمی داشته و یا اینکه روی سیستم مجرای صفراوی و بافت کبد، عوارض منفی زیادی دارد.

در بررسی اثر عصاره باکتری اشیشیا کلی و پروتئوس میرابیلیس در غلظت ۱/۴ و عصاره سودوموناس در رقت ۱/۱، پس از گذشت ۶۰ دقیقه از زمان تماس؛ بین میزان پروتواسکولکس های مرده در گروه شاهد و مطالعه تفاوت معنی داری دیده شد. به نظر می رسد تماس طولانی مدت عصاره باکتری ها با مکانیسم نامشخصی پروتواسکولکس ها را از بین می برد لکن شاید این موضوع از نظر کاربرد بالینی ارزش کمی داشته باشد زیرا یک ماده اسکولکس کش ایده آل بخصوص برای استفاده در حین جراحی برای کاهش خطر نشت و پخش پروتواسکولکس در مدت هر چه کوتاه تری تأثیر بگذارد تا بیمار زیاد تحت بیهوشی باقی نماند. همچنین در رقت ۱/۸ عصاره این باکتری در همه زمان های بررسی شده، تفاوت درصد پروتواسکولکس های مرده در دو گروه شاهد و آزمایش معنی دار بود.

در مورد استفاده از عصاره نتایج در حد انتظار نبودند که احتمالاً این نتایج ضعیف ممکن است به دلیل استفاده از غلظت نیم مک فارلند باشد که می توان برای تهیه عصاره از غلظت مثلاً سه مک فارلند استفاده کرد و نتایج را مقایسه نمود. در مطالعه قبلی [۱۵] اثر تماس باکتری زنده بر روی پروتواسکولکس بسیار مخرب بود که احتمالاً مربوط به تأثیر تخریبی مستقیم باکتری بر روی لارو باشد. احتمالاً باکتری ها با داشتن رقابت با متاسستد بر سر کسب غذا، یا ترشح موادی بر روی پیکره لارو یا ایجاد تغییرات pH در اثر فعالیت های بیولوژیک خود در درون کیست، یا ایجاد موادی که به مواد حیاتی مورد نیاز لارو باند می شوند یا نفوذ موادی از باکتری به لارو و باند شدن با اجسام آهکی و غیر قابل مصرف کردن آنها برای لارو یا با مکانیزم هایی مثل از بین بردن آنزیم های ضروری بقاء لارو یا غیر قابل برداشت و مصرف کردن مواد سوختی سلول های لارو باعث از بین رفتن لارو می شود.

جانبی را نداشته باشند مورد توجه قرار گرفته است. عوامل اسکولیسیدالی که استفاده از آنها گزارش شده است شامل: پلی وینیل-پیرولیدون ید (PVP) ۱۰٪، مخلوطی از ستریماید ۱/۵٪ و کلرگزیدین ۱۵٪، اتیل الکل ۹۵٪، پراکسید هیدروژن ۳٪، نیترات نقره ۰/۵٪، فرمالین ۲٪ و سالیسین ۳۰٪ می باشد [۱۹-۲۳]. در میان عوامل اسکولیسیدال مختلف که در گذشته حمایت می شد، فرمالین اولین ماده ای بود که اغلب استفاده می شد [۲۴]. این ماده که برای سال های متمادی به طور گسترده مورد استفاده قرار می گرفت، مشخص شد که عاملی خطرناک است و دارای خطر توکسیسیتی سیستمیک و موجد کلانژیت اسکروزان ثانویه می باشد [۲۰، ۲۵]. در نتایج مطالعه Hankins، دو مورد مرگ که یکی در یک زن جوان به علت ایست قلبی که تقریباً بلافاصله بعد از تزریق فرمالین به کیست کبدی بزرگ رخ داد و دیگری در مرد جوانی که در طول حذف کیست بزرگ کبدی که در ارتباط با کیست های متعدد صفاقی بود، بعد از اینکه فرمالین بطور تصادفی به حفره صفاق ریخته شده بود، توسعه شدید پریتونیت دیده شد. بعد از این تجارب، از الکل ۹۶٪ به جای فرمالین استفاده شد [۲۵].

کاربامات بنزیمیدازول (آلبندازول و میندازول)، داروهای ضد کرمی هستند که مانع تجمع توپولین به میکروتوبول ها و در نتیجه اختلال در جذب گلوکز می شوند [۲۶]. در دهه ۱۹۷۰ اثبات شده است که در مقابل مرحله لاروی انگل اکینو کوکوس گرانولوزوس، بنزیمیدازول ها مؤثر هستند [۲۷]. اما جذب ضعیف آنها در روده و توانایی پخش آنها در سراسر دیواره کیست به مایع کیست محدود است. بنابراین، به نظر می رسد که عوامل کموتراپی تسکین دهنده هستند تا درمانی [۲۸]. سالیسین هیپرتونیک یکی از معمول ترین عوامل اسکولیسیدال در جهان است. از دلایل اصلی استفاده از آن این است که اثرات آن، یک شیب اسمزی قوی در سراسر غشاء کوتیکولی ایجاد می کند و همچنین یکی دیگر از مزیت های منحصربفرد آن، چگالی بالای آن می باشد که جهت ارزیابی رقت محلول در حفره، ارزیابی حضور مناسب تماس محلول با تمام نقاط ضایعه و بررسی کردن برای حضور ارتباطات صفراوی است [۲۹]. اگرچه سالیسین هیپرتونیک به عنوان عامل اسکولیسیدال به مدت ۵۰ سال در غلظت های مختلف (۳۰-۳٪) و زمان های مختلف (۳۰-۵ دقیقه) استفاده شده است، اما هیچ گزارشی درباره اینکه کدام غلظت برای زمان های مواجهه مناسب است، وجود ندارد [۳۰]. مشخص شده که غلظت بالای سالیسین می تواند باعث کلانژیت اسکروزان و تنگی مجرای صفراوی شود [۳۰]. همچنین سه مورد از پریتونیت اسکروزان

## نتیجه گیری

علوم پزشکی همدان که بخشی از هزینه این مطالعه را تأمین کردند، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود. همچنین از مسئولین محترم کشتارگاه بروجرد که در جمع آوری نمونه‌های کیست مساعدت کردند و ریاست و پرسنل محترم آزمایشگاه بیمارستان تأمین اجتماعی بروجرد و مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی (معاونت محترم تحقیقات د ع پ لرستان) به خاطر مساعدت‌هایشان قدردانی می‌گردد. لازم به ذکر است نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان هیچگونه تعارضی نداشت.

نتایج مطالعه حاضر حاکی از تأثیر ناچیز عصاره باکتری در از بین بردن اسکولکس‌های زنده است و مرگ لاروها در کیست‌های عفونی شده می‌تواند به دلیلی غیز از تأثیر فراورده‌های موجود در عصاره باکتری عفونی کننده باشد.

## سپاسگزاری

این مقاله از پایان نامه کارشناسی ارشد انگل شناسی تهیه شده است. از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه

## REFERENCES

- Abunna F, Fentaye S, Megersa B, Regassa A. Prevalence of bovine hydatidosis in Kombolcha ELFORA abattoir, North Eastern Ethiopia. *Open J Anim Sci.* 2012;2:281-6. DOI: 10.4236/ojas.2012.24038
- Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(1):107-35. PMID: 14726458
- Romig T. Epidemiology of echinococcosis. *Langenbecks Arch Surg.* 2003;388(4):209-17. DOI: 10.1007/s00423-003-0413-3 PMID: 12937989
- Standker L, Beress L, Garateix A, Christ T, Ravens U, Salceda E, et al. A new toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* with effect on sodium channel inactivation. *Toxicon.* 2006;48(2):211-20. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.05.001 PMID: 16814340
- Topcu O, Aydin C, Arici S, Duman M, Koyuncu A, Sen M. The effects of various scolicalid agents on the hepatopancreatic biliary system. *Visceral Med.* 2006;22(3):185-90. DOI: 10.1159/000094710
- Kushwaha JK, Sonkar AA, Verma AK, Pandey SK. Primary disseminated extrahepatic abdominal hydatid cyst: a rare disease. *BMJ Case Rep.* 2012;2012. DOI: 10.1136/bcr.2012.5808 PMID: 22669859
- Durgun Yetim T, Basoglu A, Taslak Sengul A, Yetim I, Serdar Bekdemir O, Hokelek M. Comparison of the protoscolical effectiveness of hypertonic saline, povidone-iodine and albendazole solutions in an experimental lung hydatid cyst model. *J Int Med Res.* 2011;39(4):1230-8. PMID: 21986125
- Eyüpoğlu B, Doğanay M, Reis E, Yüksek YN, Kulaçoğlu S, Kama NA. The effects of scolicalid agents on hepatopancreaticobiliary system "An experimental study". *Turkish J Gastroenterol.* 1999;10:280-6.
- Caglar R, Yuzbasioglu MF, Bulbuloglu E, Gul M, Ezberci F, Kale IT. In vitro effectiveness of different chemical agents on scolices of hydatid cyst. *J Invest Surg.* 2008;21(2):71-5. DOI: 10.1080/08941930701883640 PMID: 18340623
- Adas G, Arikian S, Kemik O, Oner A, Sahip N, Karatepe O. Use of albendazole sulfoxide, albendazole sulfone, and combined solutions as scolicalid agents on hydatid cysts (in vitro study). *World J Gastroenterol.* 2009;15(1):112-6. PMID: 19115476
- Puryan K, Karadayi K, Topcu O, Canbay E, Sumer Z, Turan M, et al. Chlorhexidine gluconate: an ideal scolicalid agent in the treatment of intraperitoneal hydatidosis? *World J Surg.* 2005;29(2):227-30. DOI: 10.1007/s00268-004-7587-x PMID: 15650798
- Tozar E, Topcu O, Karayalcin K, Akbay SI, Hengirmen S. The effects of cetrimide-chlorhexidine combination on the hepato-pancreaticobiliary system. *World J Surg.* 2005;29(6):754-8. DOI: 10.1007/s00268-005-7782-4 PMID: 15880274
- Taran M, Karimi N, Abdi J, Sohailikhah Z, Asadi N. Larvicidal Effects of Essential Oil and Methanolic Extract of *Hymenocarter longiflorus* (Lamiaceae) Against *Echinococcus granulosus*. *J Essential Oil Bear Plant.* 2013;16(1):85-91.
- Mahon CR, Lehman DC, Manuselis JG. Textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2015.
- Fallah M, Kavand A, Yousefi Mashouf R. Infected hydatid cysts bacteria in slaughtered livestock and their effects on protoscolices degeneration. *Jundishapur J Microbiol.* 2014;7(6):e10135. DOI: 10.5812/jjm.10135 PMID: 25371792
- Ormeci N. PAIR vs Ormeci technique for the treatment of hydatid cyst. *Turk J Gastroenterol.* 2014;25(4):358-64. DOI: 10.5152/tjg.2014.13018 PMID: 25254515
- Buttenschoen K, Carli Buttenschoen D. Echinococcus granulosus infection: the challenge of surgical treatment. *Langenbecks Arch Surg.* 2003;388(4):218-30. DOI: 10.1007/s00423-003-0397-z PMID: 12845535
- Taran M, Azizi E, Shikhvaisy A, Asadi N. The anthelmintic effect of *Pistacia khinjuk* against protoscolices of *Echinococcus granulosus*. *World J Zool.* 2009;4(4):291-5.
- Besim H, Karayalcin K, Hamamci O, Gungor C, Korkmaz A. Scolicalid agents in hydatid cyst surgery. *HPB Surg.* 1998;10(6):347-51. PMID: 9515230
- Langer JC, Rose DB, Keystone JS, Taylor BR, Langer B. Diagnosis and management of hydatid disease of the liver. A 15-year North American experience. *Ann Surg.* 1984;199(4):412-7. PMID: 6712316
- Sayek I, Onat D. Diagnosis and treatment of uncomplicated hydatid cyst of the liver. *World J Surg.* 2001;25(1):21-7. PMID: 11213152
- Ayles HM, Corbett EL, Taylor I, Cowie AG, Bligh J, Walmsley K, et al. A combined medical and surgical approach to hydatid disease: 12 years' experience at the Hospital for Tropical Diseases, London. *Ann R Coll Surg Engl.* 2002;84(2):100-5. PMID: 11995745
- Yol S, Kartal A, Tavli S, Sahin M, Vatansav C, Karahan O, et al. Open drainage versus overlapping method in the treatment of hepatic hydatid cyst cavities. *Int Surg.* 1999;84(2):139-43. PMID: 10408285
- Aggarwal AR, Garg RL. Formalin toxicity in hydatid liver disease. *Anaesthesia.* 1983;38(7):662-5. PMID: 6869739
- Hankins JR. Management of Complicated Hepatic Hydatid Cysts. *Ann Surg.* 1963;158:1020-34. PMID: 14081536
- Lacey E. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today.* 1990;6(4):112-5. PMID: 15463312
- Heath DD, Chevis RAF. Mebendazole and hydatid cysts. *Lancet.* 1974;304(7874):218-9.
- Guidelines for treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. WHO Informal Working Group on Echinococcosis. *Bull World Health Organ.* 1996;74(3):231-42. PMID: 8789923
- Acunas B, Rozanes I, Celik L, Minareci O, Acunas G, Alper A, et al. Purely cystic hydatid disease of the liver: treatment with percutaneous aspiration and injection of hypertonic saline. *Radiology.* 1992;182(2):541-3. DOI: 10.1148/radiology.182.2.1732977 PMID: 1732977
- Kayaalp C, Balkan M, Aydin C, Ozgurtas T, Tanyuksel M, Kirimlioglu V, et al. Hypertonic saline in hydatid disease. *World J Surg.* 2001;25(8):975-9. PMID: 11571978
- Momblano P, Pradere B, Jarrige N, Concina D, Bloom E. Metabolic acidosis induced by cetrimonium bromide. *Lancet.* 1984;2(8410):1045. PMID: 6149431
- Baraka A, Wakid N, Yamout F. Methemoglobinemia during surgical excision of hydatid cyst. *Middle East J Anaesthesiol.* 1980;5(8):509-13. PMID: 7253942

## In vitro Evaluation of the Effect of Bacterial Extract, Isolated From Infected Hydatid Cysts, on Protoscolex

Mohammad Sardari<sup>1</sup>, Amirhossein Maghsood<sup>2</sup>, Mohammad Yousef Alikhani<sup>3</sup>, Mohammad Fallah<sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup> MSc of Parasitology, Social Security Organization of Broujerd, Kowsar Hospital, Broujerd, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor of Parasitology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>3</sup> Professor of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>4</sup> Professor of Parasitology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

\* Corresponding author: Mohammad Fallah, Professor of Parasitology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. E-mail: fallah@umsha.ac.ir

DOI: 10.21859/hums-23044

Received: 03.08.2016

Accepted: 18.12.2016

### Keywords:

Bacterial Extract  
Hydatid Cyst  
Protoscolex  
Scolicidal  
Sonication

### How to Cite this Article:

Sardari M, Maghsood A, Alikhani M Y, Fallah M. In vitro Evaluation of the Effect of Bacterial Extract, Isolated From Infected Hydatid Cysts, on Protoscolex. *Sci J Hamadan Univ Med Sci.* 2017; **23**(4):352-359. DOI: 10.21859/hums-23044

© 2017 Hamadan University of Medical Sciences.

### Abstract

**Introduction:** To date, surgery has been the treatment of choice for hydatid cyst, with regard to danger of leakage of hydatid cyst contents into viscera and production of secondary cysts, after spread of protoscolices. Different scolicidal agents get injected into cyst for preventing the secondary cyst production, which may cause different side effects in host, especially in the surrounding tissues. In this research, the scolicidal effects of bacterial extract isolated from infected hydatid cyst was evaluated.

**Methods:** In this experimental-laboratorial study, at first, isolation and identification of the infecting bacteria of hydatid cyst were performed at the level of species. Then, total the bacterial extract was prepared by sonication method, and serial dilutions (1.1, 1.2, 1.4, 1.8, 1.16, 1.32 and 1.64) were prepared using sterile saline as the solvent. The obtained alive larvae at the times of 5, 10, 20, 40 and 60 minutes were placed in those dilutions and mean of dead protoscolices were determined using eosin exclusive staining method.

**Results:** The identified bacteria isolated from the infected hydatid cysts were as follows: *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*, *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. The extract of isolated bacteria at the mentioned times had no considerable scolicidal effects. For example, the whole extract of *P. aeruginosa* after 60 minutes of exposure showed a maximum of 13.17% scolicidal effect.

**Conclusion:** The results of this study showed low scolicidal effect of bacterial extracts isolated from hydatid cyst. Degeneration of scolices in infected cysts can be due to other reasons than bacterial extract.