مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان
مقاله پژوهشی
دوره ۲۳، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵

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

محمد سرداری [۱]، امیرحسین مقصود [۲]، محمد یوسف علیخانی [۳]، محمد فلاح [۴،*]

[۱] کارشناسی ارشد انگل شناسی، سازمان تأمین اجتماعی بروجرد، بیمارستان کوثر، بروجرد، ایران
[۲] دانشیار گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
[۳] استاد گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
[۴] 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

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.

چکیده

مقدمه: درمان انتخابی کیست هیداتیک جراحی می‌باشد. با توجه به خطر نشت پروتواسکولکس ها 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 دراین مطالعه اثر اسکولکس کشی عصاره باکتری‌های جدا شده از کیست هیداتیک عفونی شده مورد بررسی قرارگرفت.

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 ۱/۳۲،۱/۱۶، 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 قرارداده شد. میانگین درصد پروتواسکولکس های مرده با رنگ آمیزی حیاتی ائوزین و به کمک میکروسکپ نوری تعیین گردید.

یافته ها: پنج نوع باکتری از کیست‌های عفونی شده جدا شدکه شامل استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، اشریشیا کلی، پروتئوس میرابیلیس و سودوموناس آئروژینوزا بود. عصاره هیچ یک از باکتری‌های جدا شده از کیست هیداتیک در زمان‌های تماس مذکور تأثیر قابل قبولی بر پروتواسکولکس ها نداشتند. به عنوان نمونه عصاره تام سودوموناس آئروژنوزا پس از ۶۰ دقیقه حداکثر ۱۳/۱۷% از اسکولکس ها را از بین برد.

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

مقدمه

کیست هیداتیک یا هیداتیدوز، بیماری زئونوز مهم ایجاد شده توسط انگل اکینوکوکوس 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 زیانهای بهداشتی و اقتصادی زیادی در سراسر جهان می‌شود و شناخت و مطالعه دقیق آن جهت جلو گیری 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 دامپروری رایج است. آلودگی میزبانهای نهایی مثل سگ، گرگ، 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 پروتواسکولکس های موجود دژنره شده از بین بروند که تدریجاً محتویات کیست چرکی، پنیری شکل و نهایتاً آهکی می‌شود [۴].

هیداتیدوزیس ثانویه، عمدتاً در حفره شکمی بطور خودبخودی یا در اثر تروما (مثلاً در اثر نشت حین جراحی) که باعث پارگی کیست و انتشار پروتواسکولکس ها 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، ۶]. 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 آیودایین 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 واثرات اسکولکس کشی سالین هایپرتونیک، نیترات نقره ۰/۵%، الکل اتیلیک ۹۵%، آب اکسیژنه و بتادین، آلبندازول [۱۰]، کلرهگزیدین 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 پروتواسکولکس های 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 پروتواسکولکس های 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

کبدهای حاوی کیست‌های بزرگ توسط سرم فیزیولوژی استریل شسته شده و به محیط استریل هود کلاس دو انتقال داده شدند. ابتدا سطح آنها با الکل ۷۰ درجه ضدعفونی 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 قرارداده شده و سپس با استفاده از دستگاه سونیکاتور Hielscher ,UP200 با Cycle 1, Amplitude 100 دوبار هر بار به مدت ۵ دقیقه سونیکه شد. ازعصاره 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 وتا زمان استفاده دردمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

روش تعیین زنده بودن پروتواسکولکس ها

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 پروتواسکولکس ها، رسوب کنند و سپس مایع رویی آنها دور ریخته شد. در نهایت پروتواسکولکس های 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 پروتواسکولکس ها 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 پروتواسکولکس ها، زنده بودن آنها مشخص شد. نمونه‌هایی از کیست‌ها در صورت داشتن لاروهایی با زیست پذیری بیش از ۹۰%، جهت مطالعه انتخاب شدند.

بررسی تأثیر عصاره بر پروتواسکولکس های زنده

به هر دو میلی لیتر از غلظت‌های 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 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 رقت‌های مختلف و زمانهای مختلف با آزمون آنالیز واریانس مورد بررسی آماری قرار گرفتند.

یافته ها

باکتری‌های جدا شده شامل: اشریشیا 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 باکتری‌ها عصاره تأثیر چندانی نداشت (جدول ۱).

جدول ۱: میانگین درصد پروتواسکولکس های مرده در گروه شاهد و تست در زمان‌های مورد بررسی در رقت ۱/۱ عصاره باکتری‌ها

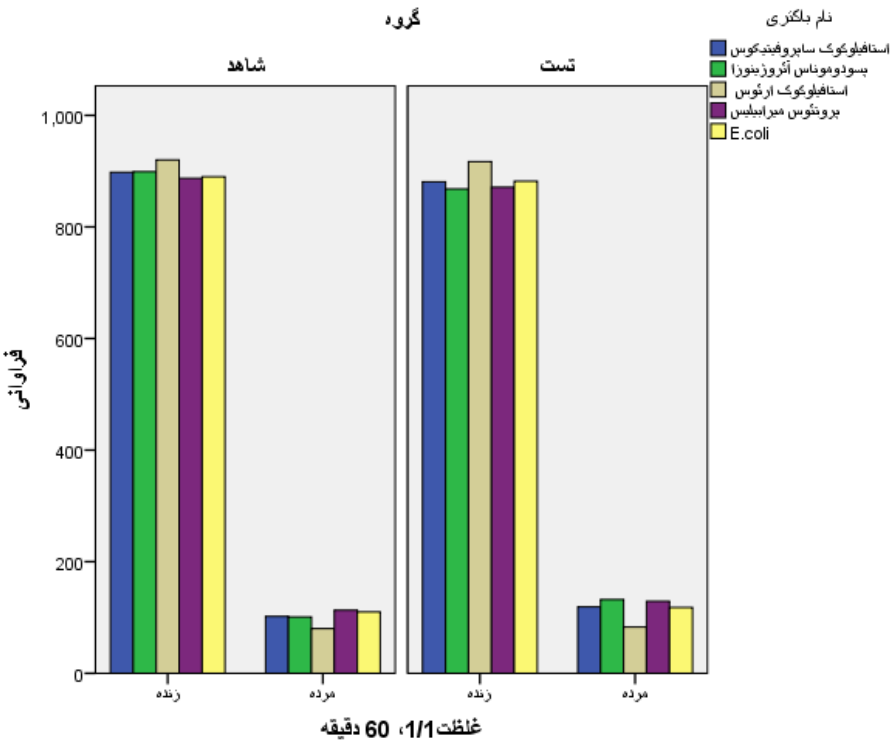
	۵ دقیقه	۱۰ دقیقه	۲۰ دقیقه	۴۰ دقیقه	۶۰ دقیقه
اشریشیا کلی					
شاهد	۶/۵	۷/۹۵	۸	۹	۱۱
تست	۶/۹	۹/۴۷	۱۰	۱۰/۱۷	۱۱/۷۷
P	۰/۷۲۱	۰/۱۳۷	۰/۱۱۸	۰/۳۶۲	۰/۵۷۴
استافیلوکوک اورئوس					
شاهد	۲/۳	۲/۳۳	۴/۷۰	۷/۶۰	۸
تست	۵	۵/۱۷	۶/۶۷	۷/۸۰	۸/۳۳
P	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۵۴	۰/۸۶۷	۰/۸۰۶
استافیلوکوک ساپروفیتیکوس					
شاهد	۸	۹/۴	۹/۷۰	۱۰	۱۰/۱۷
تست	۹	۱۰/۲	۱۰/۷۰	۱۱	۱۱/۸۶
P	۰/۴۲۳	۰/۵۴۷	۰/۴۶۰	۰/۴۶۶	۰/۲۲۵
پروتئوس میرابیلیس					
شاهد	۴/۵	۴/۸۳	۶	۸	۱۱/۳۳
تست	۶/۵	۸/۱۷	۱۰/۵	۱۱/۲۹	۱۲/۸۶
P	۰/۰۵۰	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰	۰/۰۱۲	۰/۲۷۳
پسودوموناس آئروژینوزا					
شاهد	۸/۲	۸/۶	۹/۲	۱۰	۱۰/۱۷
تست	۹	۹/۳	۱۱	۱۲	۱۳/۱۷
P	۰/۵۲۴	۰/۵۸۴	۰/۴۲۱	۰/۱۵۳	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 > ۰/۰۵). در صورتی که در باکتری استافیلوکوک اورئوس در رقت ۱/۱ در زمان ۵ دقیقه و ۱۰ دقیقه بین گروه‌های شاهد و تست تفاوت معناداری در میانگین درصد پروتواسکولکس های مرده وجود داشت (P < ۰/۰۰۱ و P= ۰/۰۰۱) و در زمان‌های دیگر تفاوت معناداری دیده نشد. در باکتری استافیلوکوک ساپروفیتیکوس در رقت ۱/۱ در هیچ کدام از زمان‌های مورد بررسی تفاوت معناداری بین میانگین درصدپروتواسکولکس های مرده در دو گروه شاهد و تست دیده نشد اما در باکتری پروتئوس میرابیلیس در رقت ۱/۱ در زمان‌های 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 = ۰/۰۵ و P= ۰/۰۰۲ و P= ۰/۰۰۰ و P = ۰/۰۱۲) 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 = ۰/۰۳۸). در بقیه رقت‌های عصاره‌ها با توجه به رقیق شدن عصاره میزان پروتواسکولکس کشی عصاره کاهش یافت به طوریکه در باکتری سودوموناس آئروژینوزا در رقت ۱/۲ عصاره ۱۲/۱۷% از پروتواسکولکس ها را از بین برد و در رقت‌های 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 وکمترین 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 زمان‌های مورد بررسی در رقت ۱/۶۴ عصاره باکتری‌ها

	۵ دقیقه	۱۰ دقیقه	۲۰ دقیقه	۴۰ دقیقه	۶۰ دقیقه
اشریشیا کلی					
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
استافیلوکوک اورئوس					
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
استافیلوکوک ساپروفیتیکوس					
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
پروتئوس میرابیلیس					
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
پسودوموناس آئروژینوزا					
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

مطالعه حاضر فعالیت پایین اسکولکس کشی 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 پروتواسکولکس ها از بین رفته و از اجساد آنها و سایر یاخته‌های نابود شده مایع هیداتیک عفونی شده و در ادامه کاملاً چرکی و پنیری و نهایتاً کلسیفیه می‌شود؛ احتمالاً عاملی که منجر به مرگ پروتواسکولس ها 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 پروتواسکولکس های زنده در زمان کوتاهی آنها را از بین می‌برد. بنابراین، تئوری فوق تا حدودی تأیید می‌شود که باکتری‌های زنده و کامل با مکانیسم‌هایی و احتمالاً با موادی پروتواسکولکس ها 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 فیستول های صفراوی، پارگی در پریتوان و... جراحی صورت می‌گیرد [۱۷, ۱۸]. مواد مختلفی هم به عنوان درمان دارویی و هم برای بی خطر نمودن جراحی از نظر نشت لارو استفاده شده که اغلب کم اثر و دارای عوارض سوء جانبی بوده‌اند. استفاده از مواد شیمیایی برای ازبین بردن پروتواسکولکس ها 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 وگیاهی به عنوان منابع جایگزین که ضمن اثر اسکولکس کشی قابل قبول، عوارض سوء

جانبی را نداشته باشند مورد توجه قرار گرفته است. عوامل اسکولیسیدالی که استفاده ازآنها گزارش شده است شامل: پلی وینیل-پیرولیدون ید (PVP) ۱۰%، مخلوطی از ستریماید ۱/۵% وکلرهگزیدین ۱۵%، اتیل الکل ۹۵%، پراکسیدهیدروژن ۳%، نیترات نقره ۰/۵%، فرمالین ۲% و سالین ۳۰% می‌باشد [۱۹-۲۳]. در میان عوامل اسکولیسیدال مختلف که درگذشته حمایت می‌شد، فرمالین اولین ماده‌ای بود که اغلب استفاده می‌شد [۲۴]. این ماده که برای سال‌های متمادی به طورگسترده مورد استفاده قرارمی گرفت، مشخص شدکه عاملی خطرناک است و دارای خطر توکسیسیتی سیستمیک و موجد کلانژیت اسکلروزان ثانویه می‌باشد [۲۰, ۲۵]. در نتایج مطالعه Hankins، دو مورد مرگ که یکی دریک 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 کیست‌های متعدد صفاقی بود، بعداز اینکه فرمالین بطور تصادفی به حفره صفاق ریخته شده بود، توسعه شدید پریتونیت دیده شد. بعد ازاین تجارب، از الکل ۹۶% به -جای فرمالین استفاده شد [۲۵].

کاربامات بنزیمیدازول (آلبندازول و مبندازول)، داروهای ضدکرمی هستند که مانع تجمع توبولین به میکروتوبول ها و در نتیجه اختلال درجذب گلوکز می‌شوند [۲۶]. در دهه ۱۹۷۰ اثبات شده است که درمقابل مرحله لاروی انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس، بنزیمیدازول ها مؤثر هستند [۲۷]. اما جذب ضعیف آنها درروده و توانایی پخش آنها در سراسر دیواره کیست به مایع کیست محدود است. بنابراین، به نظرمی رسد که عوامل کموتراپی تسکین دهنده هستند تا درمانی [۲۸]. سالین هیپرتونیک یکی از معمول-ترین عوامل اسکولیسدال درجهان است. از دلایل اصلی استفاده از آن این است که اثرات آن، یک شیب اسمزی قوی در سراسرغشاء کوتیکولی ایجاد می‌کند و همچنین یکی دیگر از مزیت‌های منحصربفرد آن، چگالی بالای آن می‌باشد که جهت ارزیابی رقت محلول درحفره، ارزیابی حضورمناسب تماس محلول با تمام نقاط ضایعه و بررسی کردن برای حضور ارتباطات صفراوی است [۲۹]. اگرچه سالین هیپرتونیک به عنوان عامل اسکولیسدال به مدت ۵۰ سال درغلظت های مختلف (۳۰-۳%) و زمان‌های مختلف (۳۰-۵ دقیقه) استفاده شده است، اما هیچ گزارشی درباره اینکه کدام غلظت برای زمان‌های مواجهه مناسب است، وجود ندارد [۳۰]. مشخص شده که غلظت بالای سالین می‌تواند باعث کلانژیت اسکلروزان و تنگی مجرای صفراوی شود [۳۰]. همچنین سه مورد ازپریتونیت اسکلروزان بعد از شستشوی صفاقی برای جلوگیری از هیداتیدوزیس ثانویه واسیدوز متابولیک و مت هموگلوبینمی در دو مورد گزارش شده است که از عوارض ستریماید می‌باشد. در واقع عوارض جانبی حاصله از هرکدام 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 می‌شود بعضاً اثرات کمی داشته و یا اینکه روی سیستم مجرای صفراوی و بافت کبد، عوارض منفی زیادی دارد.

در بررسی اثر عصاره باکتری اشریشیا 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 می‌رسد تماس طولانی مدت عصاره باکتری‌ها با مکانیسم نامشخصی پروتواسکولکس ها را از بین می‌برد 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 هرچه کوتاه‌تری تأثیر بگذارد تا بیمار زیاد تحت بیهوشی باقی نماند. همچنین در رقت ۱/۸ عصاره این باکتری در همه زمان‌های بررسی شده، تفاوت درصد پروتواسکولس 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 می‌توان 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 باکتری‌ها با داشتن رقابت با متاسستد بر سر کسب غذا، یا ترشح موادی بر روی پیکره لارو یا ایجاد تغییرات pH در اثر فعالیت‌های بیولوژیک خود در درون کیست، یا ایجاد موادی که به مواد حیاتی مورد نیاز لارو باند می‌شوند 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 آنزیم‌های ضروری بقاء لارو یا غیر قابل برداشت و مصرف کردن مواد سوختی سلول‌های لارو باعث از بین رفتن لارو می‌شود.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر حاکی از تأثیر ناچیز عصاره باکتری در از بین بردن اسکولکس های زنده است و مرگ لاروها در کیست‌های عفونی شده می‌تواند به دلیلی غیر 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 فنآوری دانشگاه 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.

REFERENCES

1. 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
2. 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
3. Romig T. Epidemiology of echinococcosis. Langenbecks Arch Surg. 2003;388(4):209-17. DOI: 10.1007/s00423-003-0413-3 PMID: 12937989
4. 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
5. Topcu O, Aydin C, Arici S, Duman M, Koyuncu A, Sen M. The effects of various scolicidal agents on the hepatopancreatic biliary system. Visceral Med. 2006;22(3):185-90. DOI: 10.1159/000094710
6. 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.02.2012.5808 PMID: 22669859
7. Durgun Yetim T, Basoglu A, Taslak Sengul A, Yetim I, Serdar Bekdemir O, Hokelek M. Comparison of the protoscolocidal 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
8. Eyüpoğlu B, Doğanay M, Reis E, Yüksek YN, Kulaçoğlu S, Kama NA. The effects of scolocidal agents on hepatopancreaticobiliary system "An experimenal study". Turkish J Gastroenterol. 1999;10:280-6.
9. 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
10. Adas G, Arikan S, Kemik O, Oner A, Sahip N, Karatepe O. Use of albendazole sulfoxide, albendazole sulfone, and combined solutions as scolicidal agents on hydatid cysts (in vitro study). World J Gastroenterol. 2009;15(1):112-6. PMID: 19115476
11. Puryan K, Karadayi K, Topcu O, Canbay E, Sumer Z, Turan M, et al. Chlorhexidine gluconate: an ideal scolicidal agent in the treatment of intraperitoneal hydatidosis? World J Surg. 2005;29(2):227-30. DOI: 10.1007/s00268-004-7587-x PMID: 15650798
12. Tozar E, Topcu O, Karayalcin K, Akbay SI, Hengirmen S. The effects of cetrimide-chlorhexidine combination on the hepato-pancreatico-biliary system. World J Surg. 2005;29(6):754-8. DOI: 10.1007/s00268-005-7782-4 PMID: 15880274
13. 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.
14. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis JG. Textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2015.
15. Fallah M, Kavand A, Yousefi Mashouf R. Infected hydatid cysts bacteria in slaughtered livestock and their effects on protoscoleces degeneration. Jundishapur J Microbiol. 2014;7(6):e10135. DOI: 10.5812/jjm.10135 PMID: 25371792
16. 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
17. 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
18. Taran M, Azizi E, Shikhvaisi A, Asadi N. The anthelmintic effect of Pistacia khinjuk against protoscoleces of Echinococcus granulosus. World J Zool. 2009;4(4):291-5.
19. Besim H, Karayalcin K, Hamamci O, Gungor C, Korkmaz A. Scolicidal agents in hydatid cyst surgery. HPB Surg. 1998;10(6):347-51. PMID: 9515230
20. 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
21. Sayek I, Onat D. Diagnosis and treatment of uncomplicated hydatid cyst of the liver. World J Surg. 2001;25(1):21-7. PMID: 11213152
22. 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
23. Yol S, Kartal A, Tavli S, Sahin M, Vatansev 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
24. Aggarwal AR, Garg RL. Formalin toxicity in hydatid liver disease. Anaesthesia. 1983;38(7):662-5. PMID: 6869739
25. Hankins JR. Management of Complicated Hepatic Hydatid Cysts. Ann Surg. 1963;158:1020-34. PMID: 14081536
26. Lacey E. Mode of action of benzimidazoles. Parasitol Today. 1990;6(4):112-5. PMID: 15463312
27. Heath DD, Chevis RAF. Mebendazole and hydatid cysts. Lancet. 1974;304(7874):218-9.
28. 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
29. 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
30. 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
31. Momblano P, Pradere B, Jarrige N, Concina D, Bloom E. Metabolic acidosis induced by cetrimonium bromide. Lancet. 1984;2(8410):1045. PMID: 6149431
32. Baraka A, Wakid N, Yamout F. Methemoglobinemia during surgical excision of hydatid cyst. Middle East J Anaesthesiol. 1980;5(8):509-13. PMID: 7253942

Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences Original Article

No 82, Volume 23, Issue 4

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

Mohammad Sardari [1], Amirhossein Maghsood [2], Mohammad Yousef Alikhani [3], Mohammad Fallah [4,*]

[1] *MSc of Parasitology, Social Security Organization of Broujerd, Kowsar Hospital, Broujerd, Iran*
[2] *Associate Professor of Parasitology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*
[3] *Professor of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*
[4] *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 protoscoleces 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.