بررسی استقرار و رشد کیست هیداتیک ثانویه در حیوانات آزمایشگاهی

دکتر غلامعلی سبزواری[۱] دکتر عبدالحسین دلیمی[۱] دکتر جاوید صدرائی[۱]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۴، شماره ۳ ، ۲۱ ـ ۱۷، (۱۳۷۸)

به منظور یافتن مناسبترین حیوان آزمایشگاهی برای استقرار و رشد کیست هیداتیک ثانویه، به ۳۶ سرموش سوری، ۲۷ سرموش صحرائی، ۲۷ سر هامستر و ۵ سر خرگوش، پروتواسکولکسهای اکینوکوکوس گرانولوزوس گوسفندی به صورت داخل محوطه صفاقی تزریق گردید. سپس به مدت ۹ ماه، ماهیانه تعداد معینی از حیوانات کالبدگشایی شدند و محوطه صفاقی، کبد، ریه، کلیه و طحال آنها از نظر آلودگی به کیست مورد بررسی قرارگرفتند. در این بررسی کیست هیداتیک ثانویه در موش سوری از ماه سوم تشکیل گردید و در ماههای بعدی بخصوص ماه هشتم و نهم بخوبی رشد نمود. کلیه کیستهای تشکیل شده غیر بارور و استریل بوده‌اند. در بررسی آسیب‌شناسی دیواره کیست، واکنش سلولهای دفاعی بوضوح دیده می‌شد. در دو سر از پنج سر خرگوش تحت آزمایش، کیست هیداتیک ثانویه تشکیل شده بود و به جز یک مورد موش صحرایی که در ماه نهم دارای یک کیست غیربارور بود در سایر موشهای صحرایی و هامستر تحت آزمایش کیست هیداتیک ثانویه مشاهده نگردید.

واژه‌های کلیدی: اکینوکوکوس گرانولوزوس، کیست هیداتیک، حیوانات آزمایشگاهی

هیداتیدوزیس از آلودگیهای انگلی مشترک انسان، علفخواران و گوشتخواران وحشی و اهلی است که از لحاظ اقتصادی، اجتماعی و بهداشتی حایز اهمیت می‌باشد. سگ به عنوان میزبان اصلی و عمده انگل، با دفع تخم انگل همراه با مدفوع در مزارع سبب آلودگی علوفه، سبزیجات و آب می‌شود. انسان در اثر تماس نزدیک با سگ و مصرف سبزیجات و نشخوارکنندگان با خوردن علوفه آلوده به تخم انگل به بیماری مبتلا می‌شوند.

با توجه به مشکلات اقتصادی، اجتماعی و بهداشتی ناشی از ابتلا به کیست هیداتیک، انجام تحقیقات در موضوعات همه‌گیرشناسی، ایمنی‌شناسی، فیزیولوژی، پیشگیری، کنترل و درمان آن ضروری است. برای انجام اکثر این تحقیقات به محیطهای مناسب آزمایشگاهی (In vitro) و موجود زنده (In vivo) برای رشد و نگهداری مراحل مختلف انگل نیاز است. محققان در مناطق مختلف جهان مطالعاتی در مورد رشد کیست هیداتیک ثانویه ازطریق تزریق پروتواسکولکس به انواع مختلف حیوانات آزمایشگاهی انجام داده ولی نتایج متفاوتی به دست آورده‌اند (۸ و ۷، ۵، ۴، ۳، ۲، ۱). تاکنون چنین مطالعه‌ای در داخل کشور انجام نگرفته است. به طور یقین با تعیین مناسبترین حیوان آزمایشگاهی برای رشد کیست هیداتیک ثانویه می‌توان از آن برای انجام مطالعات مختلف مربوط به کیست هیداتیک استفاده نمود. این مطالعه در پی آن بوده است که با تزریق پروتواسکولکسهای زنده کیست هیداتیک اولیه گوسفندی به انواع مختلف حیوانات آزمایشگاهی مناسبترین آنها را به عنوان مدل آزمایشگاهی برای کیست هیداتیک معرفی نماید.

مواد و روش کار

در این تحقیق از چهار نوع حیوان آزمایشگاهی (موش سوری، خرگوش، موش صحرایی و هامستر) که سن آنها بین ۶ الی ۷ هفته و از جنس نر بودند استفاده گردید. کبد، ریه گوسفند آلوده به کیست هیداتیک از کشتارگاه جمع‌آوری گردید. سپس در شرایط استریل کیستها را شکافته و محتویات کیستها را در ظروف استریل جمع‌آوری نموده و سه الی پنج بار رسوب پروتواسکولکسها را با محلول سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد، سپس محلول رویی را دور ریخته و روی رسوب محلول هانکس حاوی پپسین (۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) ریخته و با اسید کلریدریک pH آنرا تا ۲ تنظیم نموده و به مدت ۴۰ الی ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده سپس دوباره سه الی پنج بار پروتواسکولکسها با سرم فیزیولوژی شستشو داده و صد واحد پنی‌سیلین و ۲۰۰ میکروگرم استرپتومایسین به هر میلی‌لیتر مخلوط اضافه گردید. برای تشخیص زنده بودن پروتواسکولکسها از روش رنگ‌آمیزی با ائوزین ۰/۱ درصد استفاده شد و برای اطمینان بیشتر فعالیت سلولهای شعله‌ای پروتواسکولکسهای رنگ نگرفته در زیر میکروسکوپ نیز ارزیابی گردید. برای شمارش تعداد پروتواسکولکسها، مخلوط را به هم زده بلافاصله ۰/۱ میلی‌متر از آن را در ظرف پتری خط کشی شده و لام مکعبی ریخته و در زیر استریومیکروسکوپ تعداد پروتواسکولکسها شمارش گردید. این عمل سه با در پتری درجه بندی شده و سه بار در لام مکعبی انجام و متوسط تعداد پروتواسکولکس در حجم معینی از مخلوط سرم فیزیولوژی و پروتواسکولکس تعیین گردید. پس از انجام شمارش، به ۳۶ سر موش سوری سویه NMRI هر کدام حدود هزار پروتواسکولکس و به ۲۷ سر موش صحرایی سویه NMRI هر کدام حدود هشت‌هزار پروتواسکولکس و به ۲۷ سر هامستر سفید هر کدام حدود ده هزار پروتواسکولکس و به ۵ سر خرگوش سفید نیوزلندی حدود یکصد هزار پروتواسکولکس به صورت داخلی صفاقی تزریق گردید.

به جز خرگوش هر ماه یک نهم حیوانات آزمایشگاهی تحت مطالعه و در مورد خرگوش از ماه پنجم، هر ماه یک خرگوش را کالبد گشایی کرده و محوطه صفاقی، کبد، طحال، کلیه و ریه آنها از لحاظ ماکروسکوپی و ظاهری و از طریق ایجاد برشهای متعدد و به کمک استریومیکروسکوپ از لحاظ آلودگی به کیست هیداتیک مورد بررسی قرار می‌گرفت. در صورت مشاهده کیست، جهت تهیه مقطع بافتی، اندام آلوده در محلول فرمالین ۵ درصد قرار داده می‌شد سپس مقاطع بافتی از آنها تهیه کرده و با هماتوکسیلین - ائوزین و پاس رنگ‌آمیزی می‌گردید در خاتمه دیواره کیست و واکنش بافتی اطراف آن مورد بررسی آسیب‌شناسی قرار می‌گرفت.

نتایج

نتایج این تحقیق بر حسب حیوانات مختلف به شرح زیر بوده است.

موش کوچک آزمایشگاهی (سوری): در کالبد گشایی این موشها در ماههای اول و دوم در محوطه شکمی و احشاء آنها فقط نقاط فیبروزی مشاهده شد در ماه سوم در دو سر آنها کیست هیداتیک ثانویه دیده شد. بالاترین قطر این کیست‌ها ۴/۳۲×۲/۷۲ میلی‌متر بوده است. در ماه چهارم آلودگی دو عدد کیست روی پرده دیافراگم و به صورت آزاد در محوطه شکمی دو سرموش مشاهده شد قطر بزرگترین کیست ۴/۳۸×۳/۸ میلی‌متر بوده است. در ماه پنجم کیست هیداتیک ثانویه در بافت کبد دو سر از موشها تشکیل شده بود در ماههای ششم،

۱) گروه آموزشی انگل‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران - ایران.

هفتم، هشتم و نهم تعداد بیشتری کیست با قطر بزرگتر مشاهده می‌شد. بدین ترتیب که در محوطه شکمی دو سر موش در ماه نهم ۸ و ۱۴ عدد کیست هیداتیک ثانویه مشاهده گردید. قطر بزرگترین این کیست‌ها ۲۳/۴×۱۴/۵میلی‌متر بوده است. در بررسی محتویات کیست‌ها با چشم غیر مسلح و همچنین با کمک استریومیکروسکوپ، کیستها همگی غیربارور بودند (جدول ۱ و تصویرهای ۱ الی ۳).

خرگوش: خرگوشها از ماه پنجم بعد از آلودگی، کالبدگشایی شدند. در ماههای پنجم، ششم و هفتم کالبد گشایی در محوطه صفاقی، کبد، ریه، کلیه و طحال علایمی از تشکیل کیست هیداتیک مشاهده نگردید. ولی در ماه هشتم آلودگی، در سطح داخلی شکم یک مجموعه کیستی چسبیده به هم به قطر ۶×۶/۱میلی‌متر تشکیل شده بود. در ماه نهم آلودگی یک کیست غیربارور به قطر ۵×۵/۸۹ میلی‌متر، آزاد در محوطه شکمی و یک کیست چسبیده به سطح داخلی شکم به قطر ۹/۴×۸/۹ میلی‌متر، مشاهده گردید (جدول ۲).

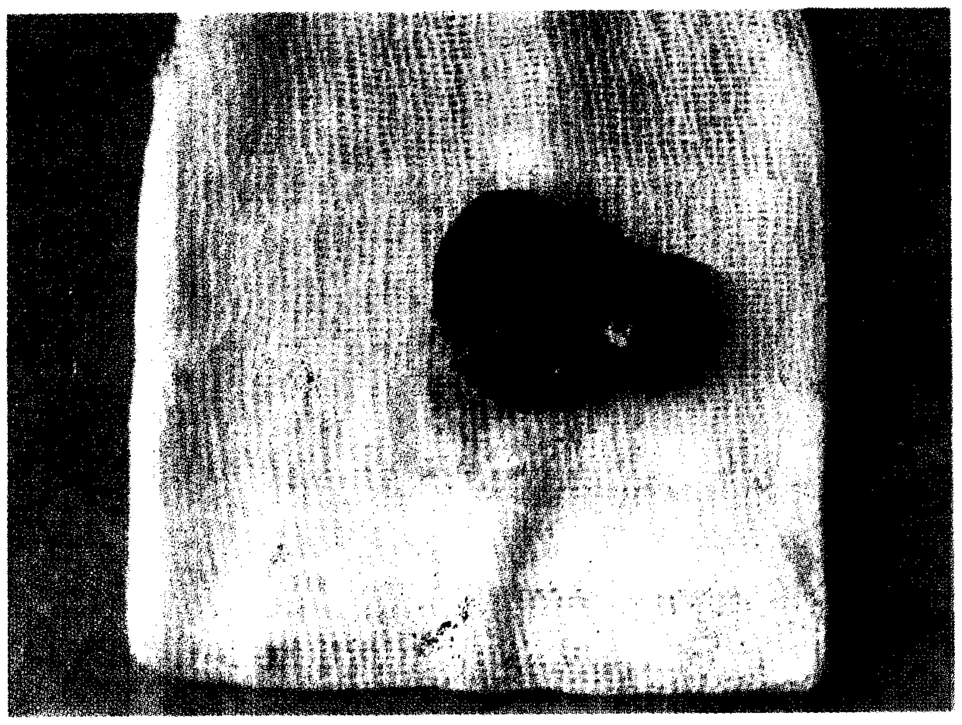
موش صحرایی و هامستر: در ماههای اول، دوم و سوم آلودگی در محوطه صفاقی و احشاء محوطه شکمی نقاط فیبروزه و اجسام کپسول شده حاوی پروتواسکولکس مرده چسبیده به اعضا مختلف بخصوص در سطح روده‌ها و چین‌های صفاقی مشاهده گردید به علاوه دانه‌هایی روی پرده دیافراگرام دیده می‌شد. بزرگی طحال، غدد لنفاوی نیز به وضوح مشاهده می‌شد. شدت این ضایعات و آسیب‌های عضوی در هامستر بیش از موش صحرایی بوده است. در هر دو نوع حیوان از ماه چهارم به بعد از شدت ضایعات کاسته شده، به طوری که از ماه ششم محوطه صفاقی عاری از هر گونه ضایعه بود. فقط در یک سر موش صحرایی در ماه نهم آلودگی یک کیست غیربارور به صورت آزاد در محوطه

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

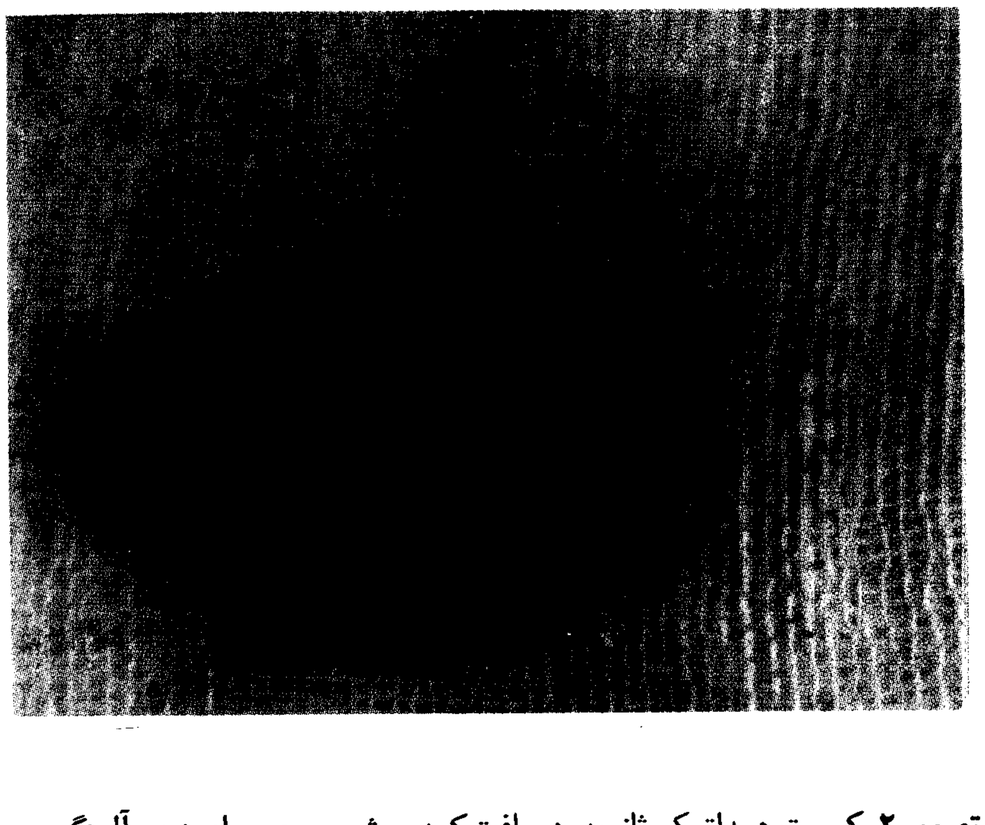
سویه حیوان (تعداد)	تعداد پروتواسکولکس تزریقی	تعداد حیوان آلوده شده	مدت زمان آلودگی(ماه)	نتیجه کالبدگشایی (تعداد)	
				مثبت	منفی
NMRI (۳۶)	۱۰۰۰	۴	۱	-	۴
		۴	۲	-	۴
		۴	۳	۲	۲
		۴	۴	۲	۲
		۴	۵	۲	۲
		۴	۶	۱	۲
		۴	۷	۳	-
		۴	۸	۴	-
		۴	۹	۴	-
جمع (درصد)				۱۸ (۵۲/۹)	۱۵ (۴۷/۱)

جدول ۲ - نتایج رشد کیست هیداتیک ثانویه در خرگوش با تزریق داخل صفاقی پروتواسکولکس اکینوکوکوس گرانولوزوس گوسفندی

سویه حیوان (تعداد)	تعداد پروتواسکولکس تزریقی	تعداد حیوان آلوده شده	مدت زمان آلودگی(ماه)	نتیجه کالبدگشایی (تعداد)	
				مثبت	منفی
خرگوش سفید نیوزلندی (۵)	۱۰۰۰۰۰	۱	۵	-	۱
		۱	۶	-	۱
		۱	۷	-	۱
		۱	۸	۱	-
		۱	۹	۱	-
جمع (درصد)				۲ (۴۰)	۳ (۶۰)

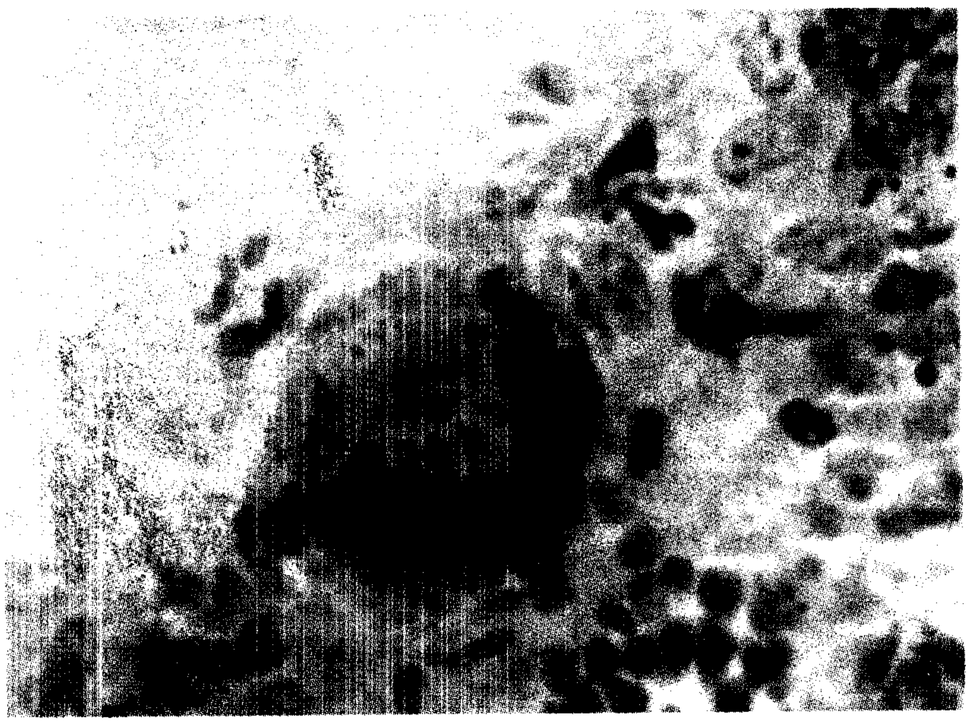


تصویر ۱ـ کیست هیداتیک ثانویه در بافت کبد موش سوری، ماه سوم آلودگی.

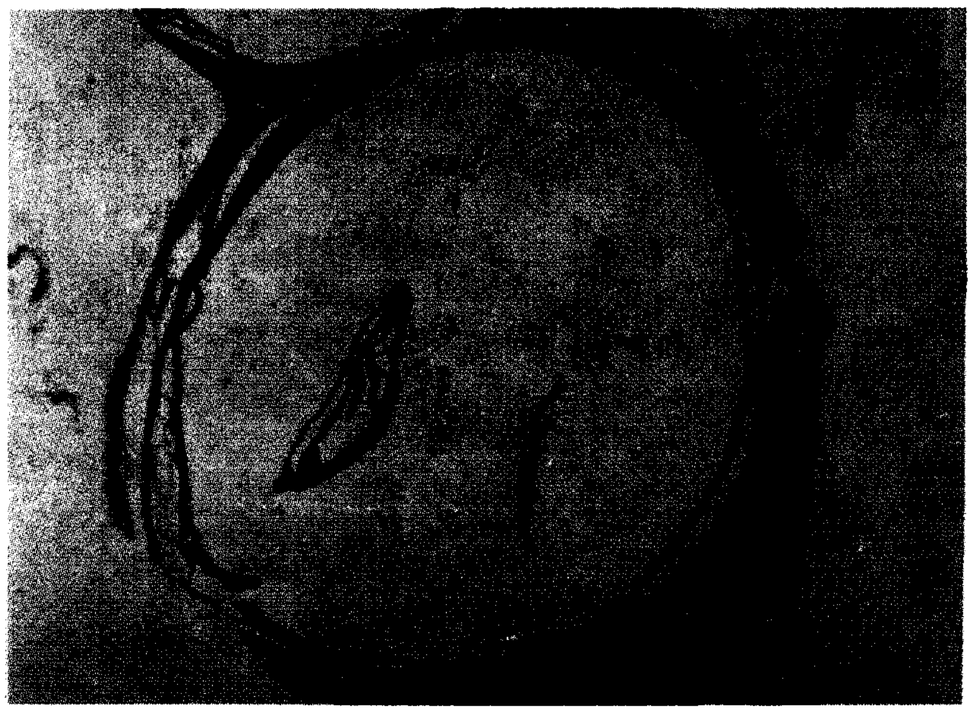


تصویر ۲ـ کیست هیداتیک ثانویه، در بافت کبد موش سوری، ماه پنجم آلودگی.

تصویر ۳ـ کیست هیداتیک ثانویه در محوطه شکمی موش سوری، (۱۴ کیست) ماه نهم آلودگی.



تصویر ۴ـ سلولهای غول‌آسا (giant cell) نعل اسبی در مقابل دیواره کیست هیداتیک در کبد موش سوری، رنگ‌آمیزی H & E (۱۰۰۰×).



تصویر ۵ـ دیواره کیست هیداتیک ثانویه (قهوه‌ای)، بافت کبد موش سوری (آبی)، رنگ‌آمیزی پاس، (۱۲ ×).

تصویر ۶ـ دیواره کیست هیداتیک ثانویه (کهربایی)، بافت کبد موش سوری، (قرمز مایل به قهوه‌ای)، رنگ‌آمیزی H & E (۱۲ ×).

شکمی به قطر ۶×۶/۵۸ میلی‌متر، دیده شد.

نتایج بررسی مقاطع بافتی: پس از تهیه مقاطع بافتی و رنگ‌آمیزی با رنگهای هماتوکسیلین - ائوزین و پاس، به وسیله میکروسکوپ ساختمان دیواره کیست و واکنش دفاع سلولی بافت کبد بررسی گردید، واکنش سلولهای دفاعی به صورت واکنش آماسی تجمع ماکروفاژها، دیو سلولهای نعل اسبی ائوزینوفیلها و وجود دیواره‌های کیست و حفره کیست به وضوح مشاهده می‌شد (تصویرهای ۴ تا ۶).

بحث

موش سوری: اکثر محققان برای بررسی رشد کیست هیداتید در حیوانات آزمایشگاهی، از پروتواسکولکس که کم خطر می‌باشد، استفاده نموده‌اند بر همین اساس بررسی‌هایی با استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (خرگوش، موش سوری، موش صحرایی، هامستر، خوکچه هندی، ژربیل و غیره) و تزریق پروتواسکولکس به آنها انجام شده است.

دیو (Deve) (۱۹۳۵)، دیول و دی کومان (De Cooman) (۱۹۳۸)، کوت‌لن (Coutelen)، لوکارت (Locroart) و کوچت (Cochet) (۱۹۳۹)، موش سفید را با پروتواسکولکس کیست هیداتید گوسفندی به طریق داخل صفاقی آلوده نموده و اظهار داشتند که موش سفید حیوان واسط مناسبی برای ایجاد کیست هیداتیک ثانویه است (۱).

طبق گزارش اسکینازی (Schinazi) و کلی‌چائن (Kilejian) (۱۹۵۹)، رشد کیست هیداتیک ثانویه در موش سفید از ۳ تا ۱۴۶ روز پس از آلودگی ایجاد می‌شود. این کیستها کوچک و غیربارور هستند.

ساین (Singh) (۱۹۶۷)، از پروتواسکولکس گوسفندی و رائو (Rao) (۱۹۸۵)، از پروتواسکولکس گاوی برای تزریق در موش استفاده نمودند که نتیجه مثبت بود (۱۱). هیت (Heath) (۱۹۷۰)، با استفاده از پروتواسکولکس کیست اولیه کبد و ریه گوسفند استرالیایی و تزریق داخل صفاقی به استرین‌های مختلف موش سوری نتیجه می‌گیرد که موش سوری حیوان مناسبی برای ایجاد کیست هیداتیک ثانویه می‌باشد (۱).

در بررسی حاضر در ماه سوم آلودگی، کیست هیداتیک ثانویه در حاشیه کبد و در ماههای بعد بخصوص در ماه نهم علاوه بر اینکه کلیه موشها کالبدگشایی شده در این ماه مثبت بودند، در دو سر از آنان هشت و چهارده کیست در محوطه شکمی، مشاهده گردید (تصویرهای ۱ تا ۳ و جدول ۱).

خرگوش: دیو (۱۹۳۵) و (۱۹۳۸) و (۱۹۴۳)، دی ول و دی کومان (۱۹۳۸)، کوت لن (۱۹۳۶)، اسکواب (۱۹۵۹) واسکواب و همکاران (۱۹۶۴) با آزمایشهای خود نتیجه گرفتند که خرگوش حیوان مستعدی برای ایجاد کیست هیداتیک ثانویه با استفاده از پروتواسکولکس گوسفندی می‌باشد (۷ و ۱).

با این وجود لوبین‌اسکیز (Lubinsk's) (۱۹۶۰)، نتیجه‌ای مخالف بدست آورد (۸).

سوئیت من (Sweatman) و یلیامز (Williams) (۱۹۶۳)، سوئیت من و دیلی (Dailey) (۱۹۶۵)، عقیده داشتند که خرگوش حیوان مناسبی برای ایجاد کیست هیداتیک ثانویه با استفاده از تزریق پروتواسکولکس کیست گوسفندی و شتر بوده ولی حیوان مناسبی برای پروتواسکولکس اسبی نمی‌باشد (۸ و ۷).

هیت (۱۹۷۰)، با استفاده از پروتواسکولکس کیست هیداتیک گوسفند استرالیایی، تشکیل کیست هیداتیک را در خرگوش گزارش کرد، در صورتی که تامپسون (Thompson) (۱۹۷۶)، نتیجه‌ای مخالف وی به دست آورد (۷ و ۱).

در مطالعه حاضر از پنج سر خرگوش آلوده شده به پروتواسکولکس کیست هیداتیک گوسفندی، در دو سر آنها، کیست هیداتیک ثانویه تشکیل گردید. (جدول ۲).

موش صحرایی: اکثر محققان، موش صحرایی را برای ایجاد کیست هیداتیک ثانویه با تزریق پروتواسکولکس کیست گوسفندی مناسب نمی‌دانند، به طوری که دیول و دی‌کومان (۱۹۳۸)، گزارش نمودند که موش صحرایی در مقابل ایجاد کیست هیداتیک ثانویه از تلقیح لارو اکینوکوکوس گرانولوزوس گوسفندی مقاومت نشان داده است (۷). دیو (۱۹۴۶)، نیز چنین نتیجه‌ای گرفت (۱).

هیت (۱۹۷۰)، نیز با تزریق پروتواسکولکس کیست هیداتیک و ریه گوسفند استرالیایی به موش صحرایی، موفق به ایجاد کیست هیداتیک ثانویه نشد (۲ و ۱).

همانند نتایج بررسی‌های سایر محققان، به جز یک مورد موش صحرایی که در ماه نهم آلودگی دارای یک کیست غیربارور در محوطه شکمی بود، سایر موشهای صحرایی مورد آزمایش در مطالعه اخیر، منفی بودند.

هامستر: اگر محققان با استفاده از پروتواسکولکس کیست اولیه حیواناتی از جمله گوسفند، اسب، بوفالو وتزریق پروتواسکولکس که به روشهای مختلف در هامستر انجام گرفته، نتایج منفی به دست آوردند.

فونتانا (Fontana) ساینز و اسکاجلیا (Scaglia) (۱۹۶۳)، با استفاده از پروتواسکولکس کیس هیداتیک انسانی موفق به ایجاد کیست هیداتیک ثانویه در هامستر نشدند (۳).

تامپسون و همکاران (۱۹۷۰)، در تحقیق خود با تزریق ۸۰۰۰ پروتواسکولکس کیست اسبی به روش داخل صفاقی گونه‌های مختلف هامستر گزارش نمودند که کیست هیداتیک ثانویه در هامستر ایجاد نمی‌شود (۱).

همانند نتایج سایر محققان، در بررسی حاضر نیز کیست هیداتیک ثانویه در هامستر ایجاد نگردید.

با توجه به نتیجه این مطالعه می‌توان گفت:

۱. موش سوری حیوان مناسبی برای رشد کیست هیداتیک ثانویه با استفاده از تزریق داخل صفاقی لارو اکینوکوکوس گرانولوزوس گوسفندی می‌باشد.

۲. رشد کیست هیداتیک ثانویه در موش سوری از ماه سوم قابل مشاهده می‌باشد.

۳. در طول ۹ ماه مطالعه، کلیه کیست‌های هیداتیک ثانویه ایجاد شده غیربارور و فاقد پروتواسکولکس بودند.

۴. به طور نسبی، خرگوش حیوان مناسبی برای ایجاد کیست هیداتیک ثانویه با تزریق داخل صفاقی پروتواسکولکس کیست هیداتیک اولیه گوسفند می‌باشد.

۵. موش صحرایی و هامستر، حیوانات آزمایشگاهی مناسبی برای ایجاد کیست هیداتیک ثانویه با تزریق داخل صفاق پروتواسکولکس کیست هیداتیک گوسفندی نمی‌باشند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات ریاست محترم مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی جناب آقای دکتر محمدی که با حمایت و پشتیبانی همه جانبه زمینه اجرای این طرح موسسه را فراهم ساختند کمال تشکر را داریم. همچنین از زحمات و راهنمایی‌های علمی آقایان دکتر سعید امانپور، ریاست محترم بخش تحقیق و تولید حیوانات آزمایشگاهی و دکتر محمد رضا غلامی از اعضای محترم هیئت علمی مؤسسه رازی تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1 . Heath, D.D. The development of Echinococcus granulosus larvae in laboratory animals. Parasitology, 60: 449-456, (1970).

2 . Kumaratilake, L.M. and Thompson, R.C.A. A comparison of Echinococcus granulosus from different geographical areas of Australia using secondary cyst develompent in mice. Inter. J. Parasitol. 13(5): 509-515. (1983).

3 . Pauluzzi, S. Serologic response of mice and rats secondary experimental hydatid disease. Am.J. Trop. Med. and hyg, 18(1): 7-12, (1869).

4 . Rycke, D. and Decooman, P. Experimental infection of mice with Echinococcus equinus of British origin. Ann. Trop. Med. and Parasitol., 74(1): 97-99, (1980).

5 . Schwabe, C.W. Larval Echinococcus infection in laboratory animals. Bull WHO, 39: 126-127, (1968).

6 . Sweatman, G.K. and Robinson, R,G., and Manktelow, B.W., Comparative observation on the scolox and grminal membrane of Echinococcus granulosus as a source of secondary Hydatid Comparative observations on the scolox and germinal membrane Cysts. Am. J. Trop. Med. Hyg, 12: 199-203, (1963).

7 . Thompson , R.C.A. The Mongoloan Gerbil (Meriones unguiculatus) as a laboratory host for the cystic stage of Echinococcus granulosus of British horse origin. Int J. Parasitol. 6: 505-511, (1976).

8 . Yamashita, J. Development of Echinococcus in laboratory animal, Bull WHO. 39: 127-129, (1968).

Development of secondary hydatid cysts in laboratory animals

Sabzavary, Gh.[1], Dalimi, A.[1], Sadraeii, J.[1]

[1]*Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran - Iran.*

The present study was undertaken to find the most susceptible laboratory host for secondary echinococcosis using Echinococcus granulosus protoscoleces obtained from hydatid cyst of sheep. For this, 36 male white mice (NMRI strain), 27 male white rats (NMRI strain), 27 mole hamsters (Albino variety) and 5 male rabbits (New Zealand white) all were injected intraperitonaelly with the protoscoleces. White mice, white rats, hamsters and rabbits each received 1000, 8000, 10000 and 100000 protoscoleces respectively. Four mice, 3 rats, 3 hamsters and 1 rabbit were killed each month during 9 months and their liver , lung, peritoneal cavity, kidney and spleen were examined for presence of hydatid cyst. Secondary hydatid cysts were found in some of the mice after 3 months post inoculation but in 9th month all the mice were found infected, Hydatid cyst developed in 2 of 5 rabbits and only in one rat but did not develop in hamsters. All the cysts found in mice , rabbits and rat were sterile and unfertile.

Key words: Echinococcus granulosus, Laboratory animals, Hydatid cyst.