تأثير درجة الحرارة على حيوية الرؤيسات الأولية لطفيلي المشوكات الحبيبية خارج الجسم الحي

آمال حسن عطية

هيئة التعليم التقني–المعهد الطبي التقني– بغداد – العراق

الخلاصة

تم إجراء هذه الدراسة خارج الجسم الحي invitro لمعرفة تأثير الخزن في درجة حرارة 4 °م على حيوية الرؤيسات الأولية لطفيلي المشوكات الحبيبية من 86 كيس عدري المعزولة من الحمير المصابة .اعتمدت حركة الخلايا اللهبية لتحديد حيوية الرؤيسات الأولية , فضلا عن استخدام الصبغة الحيوية (صبغة الآيوسين المائية 0.1%) .أظهرت نتائج الدراسة رؤيسات بنسبة حيويه94.41% لمدة 9 أيام . أوقات الحيوية الأطول لأي من العينات المجربة كان 81 يوم بنسبة بقاء مئوية 85%و ألا وطأ كان 33 % ل 13يوم .هذه الدراسة أثبتت إن الرؤيسات الأولية عندما تزال من الكيس العدري تحتفظ بحيويتها لعدة أسابيع في درجة حرارة الثلاجة عندما تحفظ في سائل عدري في أنابيب اختبار .

Effect of Temperature on the Viability of Protoscolices of *Echinococcus granulosus* invitro

Amall Hassan Atia

Commission of technical education – institute of medical technology – Baghdad- Iraq

Summery

A study was conducted invitro to determine the effects of storage at temperature 4 Cº upon the survival of protoscolices of *Echinococcus granulosus* from 86 hydatid cysts isolated from infected donkeys . Flam cell activity was the choice for viability , in addition using vital stain (0.1% aqueous eosin) . The result showed that higher percentage survival 94.41% in hydatid fluid for 9 days . The longest survival times of any of the samples tested was 81 days with the survival percentage 85% and the lowest was 33% for 13 days , showing movement till the end of this period . Our results proved the protoscolices removed from cyst retain their survival for several weeks at refrigerator temperature when stored in hydatid fluid in test tubes .

المقدمة

من خلال استعراض تاريخ المرض في العراق والعالم , نجد إن الدراسات التي أجريت على داء الأكياس العدرية أخذت اكثر من مسار ,فقد اهتم العديد من الباحثين بتسجيل ونشر المعلومات الخاصة في الإنسان والمضائف الوسطية المختلفة, والنهائية وتوجه آخرون نحو استخدام عددا من المعايير كالشكل العام للطفيلي والإصابات التجريبية والتركيب الكيماوي والتحليل الأنزيمي فضلا عن المعايير الوراثية والمناعية والتقنيات الجزيئية [1-8] .

وأجريت دراسات أخرى على تأثير عوامل مختلفة على حيوية الرؤيسات الأولية ومقاومة الأكياس العدرية المعزولة من مضائف وسطية مختلفة مثل تأثير درجات الحرارة المختلفة [9-11] . ذكر [12] إن الرؤيسات الأولية تعيش لمدة أربعة وثمانين يوما عند 4 °م مع احتفاظها بقابليتها على إحداث الإصابة لمدة طويلة في الجثث المعرضة لمدى واسع من الظروف المحيطة ، وتبقى حية لمدة عشرة أيام عند –2 °م إلى 2 °م ومن 10 °م إلى 15 °م لمدة أربعة أيام ويومين عند 20 °م إلى 22 °م و استمرت حيوية الرؤيسات عند درجات الحرارة المنخفضة –5 °م إلى – 12 °م لمدة خمسة أيام.

لم تجر دراسة عن بيان تأثير درجات الحرارة على حيوية رؤيسات الأكياس العدرية الخيلية , فانفردت الدراسة الحالية في كونها الأولى في القطر في تحديد مدى تأثير الخزن في درجة حرارة الثلاجة على حيوية رؤيسات منشئها الحمير.

المواد وطرائق العمل

- مصدر الأكياس العدرية : من الحمير المذبوحة في مجزرة حديقة الحيوان في متنزه الزوراء في بغداد , وضعت النماذج المعزولة في أكياس نايلون نظيفة ونقلت في غضون ساعتين إلى مختبر البحوث والدراسات التابع لفرع الطفيليات في كلية الطب البيطري , جامعة بغداد.
- فحص الأكياس العدرية في المختبر :فحص 86 كيسا عدريا واعتبر كل كيس يمثل عينة ,قيست أقطار الأكياس (المليمتر), ثم سحب السائل العدري بواسطة محاقن طبية بإحجام مختلفة ليحسب حجمه (المليلتر) ثم سكب السائل الطافي وتركت الرؤيسات المترسبة مع قليل من السائل العدري , فتح جدار الكيس وجمعت الرؤيسات المترسبة في قعره , بعدها أزيلت الطبقة الجرثومية ووضعت في طبق بتري زجاجي وقطعت إلى قطع صغيرة ومزجت مع كمية قليلة من السائل العدري , ثم مررت خلال مصفاة للحصول على الرؤيسات . أخذت قطرة من الراسب ووضعت على شريحة زجاجية وغطيت بغطاء الشريحة وفحصت تحت المجهر باستعمال قوة التكبير X

40 . عد الكيس خصبا عند احتوائه على الرؤيسات أو محافظ الفقسة(brood capsules)وعند عدم إيجادها اعتبر الكيس عقيما [13] .

- حساب النسبة المئوية لحيوية الرؤيسات :

أ- الفحص المباشر : تم بوضع قطرة من عالق الرؤيسات بقطارة باستور الزجاجية وغطيت بغطاء الشريحة وفحصت تحت المجهر باستعمال قوة التكبير X 40 لملاحظة حركة الخلايا اللهبية [14]

ب-استخدام صبغة الأيوسين المائية : أضيفت قطرة من الصبغة بواسطة قطارة زجاجية إلى قطرة من عالق الرؤيسات على الشريحة الزجاجية وغطيت بغطاء الشريحة وفحصت تحت المجهر باستعمال قوة التكبير X 40 وعدت الرؤيسات حية عند اصطباغها باللون الأخضر البراق , وذات غلاف سليم ووجود الحبيبات الكلسية , بينما أخذت الميتة اللون الأحمر ,لنفاذ الصبغة عبر جدرانها [16,15] , فضلا عن ملاحظة الحركة التموجية .

وأخيرا سحبت الرؤيسات الأولية العالقة في السائل العدري باستعمال محقنة طبية ووزعت في ستة وثمانين أنبوبة اختبار(5 مل / أنبوب اختبار) وخزنت في الثلاجة لتصبح جاهزة لأجراء التجربة. قسمت أنابيب الاختبار إلى أحد عشر مجموعة كل مجموعة تضم 6-8 أنبوبة اختبار (كل مجموعة تمثل كيس عدري واحد) . فحصت نماذج المجموعة الأولى خلال الساعات الأولى من بدء التجربة , حسبت نسبة حيوية رؤيساتها بالطرق آنفة الذكر أعلاه وسجل معدل القراءات تلتها المجاميع الباقية تباعا خلال فترة 2-3 أيام بين فحص وأخر لحين انتهاء فترة التجربة .

النتائج

تشير النتائج (جدول1)إلى الصفات البيولوجية للأكياس العدرية المعزولة من الحمير ,التي تم إجراء الدراسة عليها للفترة من 6/6 لغاية 8/20 /2001 .

جدول (1): الصفات البيولوجية للأكياس العدرية .

العدد الكلي للأكياس العدرية المفحوصة	العدد الكلي للأكياس العدرية الخصبة%	قياس قطر الأكياس العدرية/ ملليمتر	حجم سائل الأكياس العدرية/ ملليلتر المعدل/ المدى	عدد الرؤيسات الأولية المعدل/ المدى	نسبة حيوية الأكياس لعدرية المعدل/ لمدى
86	86 100	12.51 ±36.11 4.5–65	19.40±40.39 4–85	1300±40295.31 10–900240	19.49±71.25 11.27–94.41

أظهرت نتائج الدراسة رؤيسات أولية بنسبة حيوية 94.41% لمدة تسعة أيام .

سجلت الدراسة أوقات الحيوية الأطول لأي من العينات المجربة 81 يوم بنسبة حيوية تراوحت بين 80–88% و ألاوطأ كان بنسبة بقاء مئوية 31 و 35 % ل13 يوم لرؤيسات كيسيين عدريين ،مع وجود حركة تموجية عالية حتى نهاية فترة التجربة .

وجدت أعلى نسبة حيوية تراوحت بين 90–94% لرؤيسات ثمانية أكياس عدرية لفترة خزن9 أيام فأدناها 11 و 17% ل 15 يوم لرؤيسات كيسيين عدريين فقط(جدول 2) .

جدول(2): نسب الحيوية لرؤيسات الأكياس العدرية المجربة من 6/6 الى 20/8/ 2001

عدد الأكياس	عدد أيام الخزن	النسبة المئوية لحيوية الرؤيسات
8	9	94-90
33	81	88-80
16	56	79-71
8	18	67-61
10	71	58-50
4	71	42-40
2	13	31 و35
3	46	23 و29
2	15	11 و 17
86*		

*أجريت الدراسة على 86 كيس عدري

المناقشة

أظهرت الدراسات وجود سلالات عديدة من المشوكات الحبيبية في العراق [5&17], لذا فأن تشخيص السلالات وتحديد مدى إصابتها للأنسان والمضائف الوسطية الأخرى يعد من الأمور المهمة التي يجب إن تعطى لها الأولوية في هذه الدراسات لغرض الحد من والسيطرة على داء الأكياس العدرية بشكل فاعل , وفي الدراسة الحالية تم اعتماد معيارا ذو أهمية كبيرة في تحديد مدى بقاء ومقاومة الرؤيسات الأولية لتأثير درجات الحرارة خارج الجسم الحي .

كشفت الدراسة الحالية عن قابلية الرؤيسات في البقاء حية لفترة طويلة تجاوزت الثمانين يوما , ويعزى ذلك إلى التركيب الكيماوي للرئيسات والذي يتمثل بخليط من مكونات كيماوية معقدة كالكاربوهيدرات , البروتينيات والدهون (أحماض دهنية ودهون فوسفاتية), فضلا عن وجود الكلايكوجين بتركيز عالي ويبدو أنه مصدر طاقة للطفيليات الأخرى ,وعديد السكريات , والجلوكوز , وتلعب المركبات اللاعضوية وبعض العناصر النادرة دورا حيويا في التمثيل الغذائي ولها أهمية كبيرة كغذاء [18-21] .

كشفت نتائج الدراسة الحالية عن تباين فترات بقاء الرؤيسات حية لأكياس من نفس العضو . أشار [22] إلى إن تطور الطفيليات في مضائف غير اعتيادية ربما هو السبب الذي يؤدي إلى ظهور الاختلافات بين رؤيسات الكيس العدري في نفس المضيف .

تباينت فترات البقاء لرؤيسات الأكياس العدرية المسجلة في هذه الدراسة مع نظيراتها المعزولة من مضائف وسطية أخرى في دراسات سابقة , أجرى [10] ,في الموصل في العراق , دراستهما لاستبيان التأثيرات المناخية على حيوية عشرة أكياس عدرية معزولة من الضأن في حساب نسبة حيوية رؤيساتها المخزونة لفترات محدودة , فوجدا انه عند درجة حرارة تراوحت بين 1–5 °م بقيت الرؤيسات حية لمدة 20 يوم وبنسبة بقاء مئوية48 % . أشار [23] إلى إن معظم الروئيسات المعزولة من الجاموس قد فقدت حيويتها بعد 17–22 يوم من الخزن في درجة حرارة 4 °م , باستثناء رؤيسات كيسيين احتفظت بحيويتها لمدة 23 يوم . بينما سجل [24] بقاء الرؤيسات , من المضيف نفسه , حية لمدة أطول من 23 يوم عند درجة حرارة مماثلة بالرغم من هلاك معظمها بين 17 و 22 يوم . ذكر [16] إن أوقات بقاء الرؤيسات نحو 25 يوم بنسبة مئوية 100% و 30% بعد مضي 55 يوم من التجربة . ووجد [20] نسبة أعلى من 95% من الرؤيسات فعالة عند اليوم السابع والعاشر من التجربة . ولاحظ [25] إخفاق الرؤيسات في البقاء لمدة نصف ساعة عند درجة حرارة 56 °م . أكد [9 &10] إن درجات الحرارة العالية لا تساعد كثيرا على استمرار حيوية الرؤيسات بينما تبقى حية لفترات طويلة في درجات الحرارة المنخفضة على الرغم من تفاوت درجات الحرارة في المحيط الخارجي إلا إنها تستطيع البقاء اكثر من 24 يوم [18] .

إن تباين نتائج الدراسة الحالية والدراسات السابقة تعد دليلا حتميا على وجود سلالات مختلفة للمشوكات الحبيبية [26] .

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج الدراسات السابقة على قابلية الرؤيسات الأولية , المحفوظة في السائل العدري , في البقاء ومقاومة تأثير الخزن في درجة حرارة الثلاجة لعدة أسابيع [ ] . 18,16,10

أخيرا لسلوك الإنسان وعاداته الاجتماعية والصحية وتربية الحيوانات دور مهم في وبائية الإصابة بالأكياس العدرية وانتقالها , والجانب الأكثر أهمية فيما يتعلق بتغذية الكلاب على الأحشاء والأعضاء المصابة بأكياس

عدرية خصبة تساهم في إدامة دورة حياة ديدان المشوكات الحبيبية , وهو المألوف كثيرا . لذا إجراء هذا النوع من البحوث والتحري وتسجيل ونشر المعلومات الخاصة بالطفيلي تمثل خطوة أولى نحو

السيطرة على داء الأكياس العدرية والتي تحتاج لان تدعم بالمزيد من الدراسات التفصيلية حتى تصبح إجراءات السيطرة والقضاء على الإصابة أسهل .

المصادر

1.Williams KJ and Sweat man GK.,(1963) . " On the Transmission , Biology and Morphology of *Echinococcus granulosus Equines,* A New Subspecies of Hydatid Tapeworm in Horses in Great Britain" Parasitology , Vol.53 , No., pp. 391-407.

2.Smyth JD and Smyth MM ., (1964). "Natural and Experimental Hosts of *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* with Comments on the Genetics of Speciation in the Genus Echinococcus " Parasitology , Vol.54, No., pp.493-514.

3. الحيالي، فاطمة قاسم . (1999). دراسة نسيجية وكيماوية نسيجية لجدار الكيس العدري للمشوكات الحبيبية *Echinococcus granulosus* من الإنسان وبعض المضائف الوسطية الأخرى، رسالة ماجستير ،كلية العلوم ، جامعة الموصل ، العراق .

4. عطية ، آمال حسن .(2006). "دراسة الخصائص الشكلية للشصوص الخطمية اليرقية لتمييز السلالات العراقية من المشوكات الحبيبية " *مجلة التقني* ، المجلد 19 ، العدد 1 ،الصفحة 33-38.

5. عطية ، آمال حسن . (2002) دراسة وبائية ومقارنة الصفات الشكلية والبيولوجية للمشوكات الحبيبية باستعمال رؤيسات الأكياس العدرية المعزولة من بعض المضائف الوسطية، رسالة ماجستير، كلية الطبالبيطري، جامعة بغداد ، العراق .

6.Sobrino R, Gonzalez LM, Femandez De Luco D. Garute T and Gortazar C. "(2006). Echinococcus granulosus (cestoda Taeniidae) in the Iberian wolf " Parasitology Research ,Vol. 99 , pp. 753-756.

7.7.Al-Jamain H.H.A., (2000). DNA Analysis of Echinococcus granulosus of different host origin in Ninevah Province Iraq by PCR-RAPD Technique . PhD. Dissertation Science College , University of Mosul , Iraq.

8.8.Eckert J. Gem ell M.A. Meslin F.X. and Pawlowski Z.S.,(2001). WHO / OIE Manual on Echinococcosis in human and animals health , Rue de prony , Paris .

9.Andersen F.L. and Loveless R.M., (1978). " Survival of Protoscolices of *Echinococcus granulosus* at Constant Temperatures " Journal of Parasitology , Vol. 64 , No. 1, pp. 78-82.

10. Mahmoud S.S. and Al-Hanoon Z.A., (1981). " The Effect of temperature on the Survival of hydatid protoscolices " Journal Collage of Veterinary Medicine of Mosul ,Vol. 2 , No. 1&2 , pp. 135-140 .
11. Abdullah I.A., (2000). "Factors Affecting the Survival of Protoscolices of
12. Echinococcus granulosus in Vitro " Journal Education Sciences , Vol. 43, pp. 38-44 .
13. Smyth J.D., (1964). " The Biology of the Hydatid Organisms" Advances in Parasitology , Vol. 2 , pp. 169-219 .
14. .Himonas C. Antonia duo –Storied K. and Papadopoulos E., (1994). "Hdatidosis of food animals in Greece Prevalence of Cysts Containing Viable Protoscolices "Journal Helminthology , Vol. 68, pp. 311-313 .
15. 14.Ponce Gordo F. and Cuesta Bandera C., (1997) "Echinococcus granulosus :Characterization of the Strains Using in Vitro Vesicular Development " Journal Helminthology , Vol. 71 , pp. 61-67 .
16. Smyth J.D. and Barret N.J. (1980). " Procedure for Testing the Viability of Human Hydatid Cysts following surgical removal, especially after chemotherapy " Transactions Of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene , Vol. 74, pp. 5.
17. Casado N. Rodriguez - Caabeiro F. and Hernandez S. (1986) " In Vitro Survival of *Echinococcus granulosus* Protoscolices in Several Media , at + 4 Degrees C " Z Parasitenkd , Vol. 72, No. 2 , pp. 273-278 .
18. Abdulla I.A., (1996). Determination and differentiation of some strain of
19. Echinococcus granulosus (Batsch, 1786) in Ninevah Province Iraq . PhD. Dissertation .Science College , University of Mosul , Iraq .
20. Smyth J.D. and Davis Z., (1974). " In vitro culture of the Strobilar stage of Echinococcus ganulosus (Sheep Strain) ; A Review of Basic Problem and Results " Inter national Journal for Parasitology , Vol. 4 , pp. 631-644.
21. Sheriff D. S. Dar F. K. and Kidwi S.A., (1984) " Metallic Elements in Hydatid fluid Journal Helminthology , Vol. 58, pp. 335-336.
22. Colebrook A.L. Jenkins D.J. Jones M.K. Tatarczuch L. Lightowlers M.W., (2004). "Effect of Cyclosporin A on the Survival and Ultra structure of Echinococcus Granulosus Protoscoleces in Vitro " Parasitology , Vol. 129 , No. 4, pp. 497- 504 .
23. Lymbery A.J. and Thompson R.C.A. (1988). " Electrophoretic Analysis of Genetic Variation in Echinococcus granulosus from Domestic Hosts in Australia " Inter- national Journal for Parasitology , Vol. 18 , pp. 803-811 .
24. Hobbs R.P. Lymbery A.J. and Thompson R.C.A. (1990) ." Rostellar Hook
25. Morphology of Echinococcus granulosus (Batch 1786) from Natural and Experimental Australian Hosts and its Implications for Strain Recognition "
26. Parasitology , Vol. 101 , pp. 273-281 .

27. Deka D.K. Srivasta G.C. and Chhabra R.C. (1983). " A Note on Viability of Hydatid Cysts of Buffaloes "Indian Veterinary Journal ,Vol. 3 , pp. 100-102.
28. 24.Deka D.K. Srivasta G.C. and Chhabra R.C. (1983) " In Vitro Studies on Viability of Hydatid cyst from Buffalo " Indian Veterinary Journal , Vol. 60 , pp. 939-940 .
29. Robinson R.D. and Arme G. (1985). "Echinococcus granulosus : Failure of the Eosin - Exclusion Test to Demonstrate Death of Protoscolices " Annals of Tropical Medicine and Parasitology , Vol. 70 , No. 1 , pp. 117 .
30. Thompson R.C.A., (2001). Biology and Systemic of Echinococcus In :Eckert J. Gem ell M.A. Meslin F.X. and Pawlowski Z.S. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals : A Public Health Problem of Global Concern . World Organization for Animal Health , Rue de prony , Paris.