دراسة مقارنة لإنتاج اوساط حفظ الرؤيسات الاولية لطفيلي *Echinococcus granulosus* خارج الجسم الحي

جعفر حامد مناتي ا.د. مسلم عبد الرحمن الطعمة* ا.د.كريم هلال ثامر الديراوي *

*كلية العلوم جامعة البصرة

الخلاصة

اختبرت الدراسة الحاليه مجموعة من الاوساط بهدف الحصول على وسط للحفاظ على حيوية ونشاط الرؤيسات الاولية لطفيلي *granulosus Echinococcus* لا عدادها كوسيلة للاختبارات الحيوية والعلاجية وجد ان درجة حرارة ٤٠ درجة مئوية تحفز انبعاج الرؤيسات بالإضافة لتنشيط حركتها

اختبرت خمسة اوساط هي RPM ، السائل العدري، RPMمع protein ، محلول فسلجي مع Human serum ، protein (Amino Super) واضيف الى جميع الاوساط عصارة الكلاب الصفراء لوحظ ان وسط RPM و البروتين (Amino Super) افضل انواع الاوساط في الحفاظ على حيوية الرؤيسات لمدة طويلة بلغت اربع عشر يوما يلية وسط البروتين فقط (Amino Super) ووسط مصل الدم والمحلول الفسلجي اذ بلغ فترة بقاء الرؤيسات حية اكثر من سبعة ايام في حين بقيت الرؤيسات الاولية حية لمدة ثلاث ايام في وسط السائل العدري فقط .

المقدمة

يعد مرض الاكياس المائية من الامراض الشائعة وعالمية الانتشار (Deplazes *et al*., 2017) تحدث الاصابة بالمشوكات الحبيبية عند تناول بيوض الطفيلي مع الغذاء الملوث بفضلات المضيف النهائي (Jobre *etal*.,1996) تختلف اشكال الاكياس الناتجة عن الاصابة بالمشوكات الحبيبية بالاعتماد على العضو المصاب وتعد الازالة الجراحية هي الطريقة المثلى للتخلص من المرض ((Brunetti *etal.* 2010 يتراوح طول الطفيلي ٣-٦ ملم ويتكون جسم الطفيلي من ثلاث قطع جسمية ونتيجة للأهمية الطبية لهذا الطفيلي فقد أولته العديد من الدراسات المظهرية والعلاجية اهتماما كبيرا.

ولغرض دراسة الطفيلي بعيدا عن ظروف جسم المضيف اولى الباحثون اهتمام متزايد في محاولات زراعة الطفيلي في الزجاج فقد سمحت هذه التقنية اجراء الاختبارات دون استخدام حيوانات المختبر كما ساعدت بدراسة التغذية والفيزيولوجيا والكيمياء الحيوية للطفيلي بمعزل عن التفاعل فسلجه مضيفه Manus Mc Smyth and (١٩٨٩) ولذلك اجريت محاولات عدة لزرع الطفيلي الا ان معظمها فشل على الرغم من استخدام الباحثين اوساط ذات مكونات مناسبة لنمو طفيلي الاكياس المائية البالغ او اليرقي .الى ان اشار الباحثون(Elissondo *etal* ٢٠١٧) الى مفهوم التواصل الهرموني والذي يلعب دوراً مهماً في تفاعل بين الطفيلي و المضيف في حالات الإصابة بالديدان و اكتشف مستقبلات اسماها EmIR RTK شبية بمستقبلات الأنسولين التي ينتجها المضيف كما يمكنها التفاعل مع الأنسولين المنتج من المضيف. وعوامل هرمونية اخرى جميعها لها تأثيرات إيجابية على نمو *E. multilocularis* . لذلك طور الباحثون وسط ١٩٩ مع الاضافات الجديدة .

نتيجة لوجود العديد من البحوث التي تختبر تاثيرات الادوية المقترحة على طفيلي الاكياس المائية من خلال تجربتها على الرؤيسات الاولية (الحلفي ٢٠٠٨) والتي تعاني فيها الرؤيسات الاولية عاملين عامل وجودها خارج الجسم الحي والثاني تأثير العلاجات المقترحة بالإضافة الى ان تواجد الرؤيسات الاولية بدون وسط مناسب قد يقلل من حيويتها وايضها وهذا يجعل من المتعذر دخول الادوية للجسم بشكل مناسب لذلك حاولت الدراسة الحالية انتاج اوساط تنشط ايض الطفيلي بالإضافة الى الاحتفاظ بها حية لحين الاستخدام.

المواد وطرق العمل

١- تحضير الاوساط

حضرت مجموعة من الاوساط كما يلي

- protein (Amino Super) حضر من خلط ١% بروتين (١ غرام بروتين اذيب في ١٠٠ مل ماء مقطر) ثم اضيف ٢مل من العصارة الصفراء للكلاب
- محلول فسلجي + Human serum حضر من اضافة محلول الفسلجي الى مصل دم الانسان وبنسبة ١:١ بعدها ضيفت مادة صفراء الكلاب بنسبة ٢%
- protein+RPM حضر من اضافة بروتين ١% الى وسط RPM بنسبة ١:١ ثم اضيفت العصارة صفراء الكلاب بنسبة ٢%

- السائل العدري مع ٢% العصارة صفراء الكلاب

عقمت الاوساط بجهاز المؤصدة تحت حراره ١٢١ درجه مئوية وضغط ١,٥ بار في حين عقمت المواد التي تتلف بالحرارة مثل وسط RPM والسائل العدري بالترشيح

وزعت الاوساط على انابيب مختبرية معقمة ذات غطاء مطاطي قابل للزرق بواقع ٦مل لكل انبوب وبثلاث مكررات.

٢-جمع الطفيلي

جمعت الاكياس المائية من أكباد الاغنام المذبوحة في محلات الجزارة نقلت الاكباد المصابة الى المختبر بواسطة اكياس بلاستك .

وضعت الاكباد المصابة على وسادة بلاستك نظيفة وغسل سطحها بواسطه محلول ملحي معقم ثم عقم السطح بواسطة الكلور المركز (٣-٨%) بعدها غسلت مره اخرى بالمحلول الملحي للتخلص من بقايا الكلور بعدها سحب السائل العدري بواسطة محقنة حجم ٥٠ ملم^{٣} واعيد الى الكيس المائي كررت العملية مرات عدة دون اخراج النيدل من العينة لتحرير اكبر عدد ممكن من الرؤيسات الاولية دون فتح الكيس المائي وذلك لتجنب تلوثها .

بعدها سحب محتوى الكيس المائي وتركت الرؤيسات الاولية تترسب بعد وضع المحقنة بشكل عمودي ليكون الراشح الخالي من الرؤيسات الى الاعلى بعدها تم التخلص من السائل العدري وسحبت كمية مناسبة من المحلول الملحي المعقم الى داخل المحقنة وكررت العملية ثلاث مرات مع مراعات التخلص من الراشح قبل ترسب جميع الرؤيسات الأولية (صورة ا).

وضعت ٠,١ ملم^{٣} من عالق الرؤيسات الأولية على طبق بتري وصبغ بواسطه صبغه الايوسين المائي ١% لتقدير حيوية الرؤيسات ، حسبت اعداد الطفيلي الحية في ملم ^{٣} الواحد وركزت اعداد الطفيلي بمقدار ٣٠٠ رؤيس اولي لكل

٠,١ مل [٣] بعدها نقلت الرؤيسات الاولية الى محاقن طبية حجم ١ ملم[٣] وزرقت بها الانابيب الحاوية على الاوساط وحضنت بحاضنة Memmert تحت درجة حرارة ٣٧ مئوية. في حين حضنت مجموعة من الرؤيسات الاولية مع السائل العدري تحت حرارة ٤٠ درجة مئوية لمدة يوم واحد

صورة (ا) توضح طريقة ترسيب الرؤيسات الاولية

النتـــــــــائج

اثبتت الدراسة الحالية ان حضن الطفيلي بدرجة حرارة ٤٠ درجة مئوية تحفز عملية انبعاج الرؤيسات الى الخارج

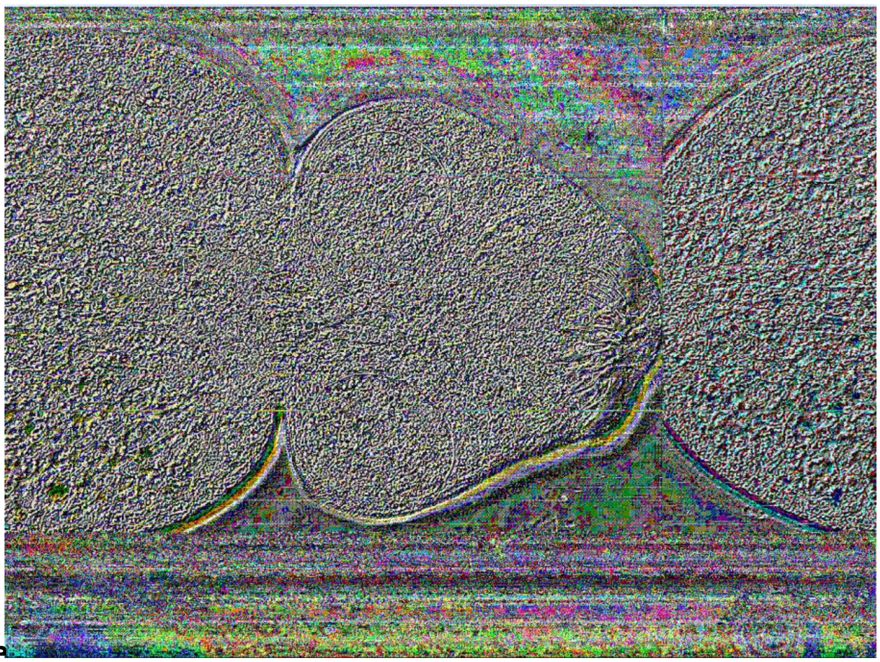
ابدت نتائج الدراسة الحالية تغايرا ملحوظا في فترة بقاء الرؤيسات الاولية باختلاف الوسط وكالتالي:

وسط السائل العدري

وجد ان زرع الرؤيسات الاولية في السائل العدري ان الرؤيسات الاولية تبقى حية لمدة ثلاثة ايام وقدرت حيوية الرؤيسات الاولية بالاعتماد على الحركة لوحظ ان رفع درجة الحرارة عامل محفز لحركة الرؤيسات الاولية, كما لوحظ موت جميع الرؤيسات في اليوم الثالث من التجربة.

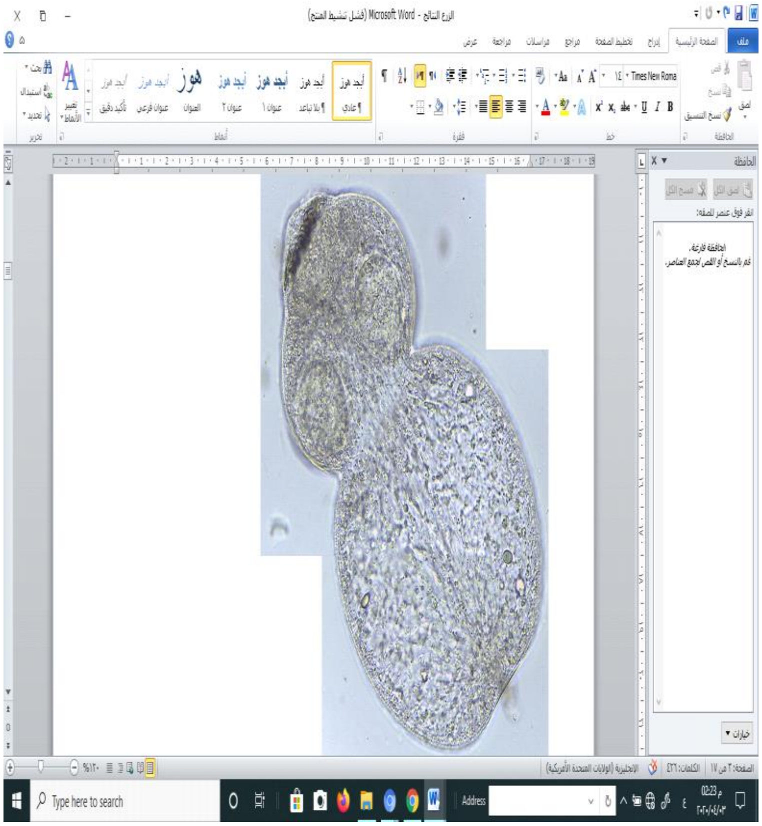
وسط البروتين (Super Amino)

في حين استمرت الروئيسات الاولية بالبقاء حية ومتحركة لمده ثمانية ايام عند زرعها على وسط البروتين وفي حالة نمو وقد اتخذت اشكال غير مختلفة عن اشكال الرؤيسات الاولية الاعتيادية (صورة ١) اذ لوحظ تكوين الطفيلي منطقة منتفخة خلف منطقة الراس صورة(٢ و ٣) قد تكون بداية تكون القطع الجسمية بلغ معدل اطوال الطفيلي ٢١٦ مايكرون وعرضة ١٤٢ مايكرون كما بلغ معدل اقطار المحاجم ٤٣ مايكرون في حين بلغ قطر طوق الاشواك ٥٩ مايكرون كما بقيت مجموعة من الروئيسات في حركة مستمرة لغرض الانبعاج للخارج خلال تلك الفترة صورة (٤)



صورة ١ توضح رؤيس اولي مزروع على وسط البروتين بعمر ثمانية ايام تظهر التصاق الطفيلي بغطاء الشريحة بواسطة احد محاجمة سهم اسود وكانت المحاجم الثلاث الاخرى حرة سهم اصفر (857) مرة

صورة(٢) توضح حدوث انتفاخ المنطقة الخلفية للرؤيس عند زرعة على وسط البروتين بعد ثمانية ايام من الزرع . (857)مرة


Type here to search
Address

صورة (3)توضح حدوث انتفاخ المنطقة الخلفية للرؤيس عند زرعة على وسط البروتين بعد ثمانية ايام من الزرع (857) .مرة

صورة ٤ توضح رؤيس غير منبعج للخارج بعد ثمان ايام من التجربة (857) مرة

وسط RPM و البروتين (Super Amino)

اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان وسط البروتين مع وسط الـ RPM افضل الاوساط المستخدمة في انماء الطفيلي اذ لوحظ استمرار نمو الطفيلي وبقائة حيا لمدة اربع عشر يوما

كما لوحظ تكون القطعة الجسمية الاولى (صورة ٥) وكان الطفيلي غير منتفخ ذو حركة نشطة بلغ معدل اطوال الطفيلي ١٨٣ ما يكرون وعرضة ١٣٢ ما يكرون كما بلغ معدل اقطار المحاجم ٤٠ ما يكرون في حين بلغ قطر طوق الاشواك ٥٧ ما يكرون ومن الجدير بالملاحظة فقد لوحظ تواجد العديد من الرويسات الغير منبعجة للخارج .

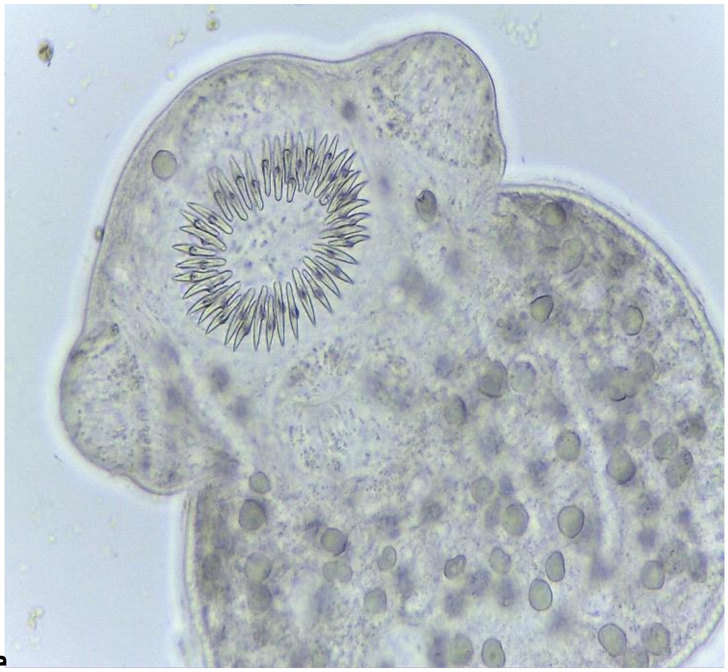
توبعت عملية انبعاج الرؤيسات والتي بدائت بتحرر اثنان من الممصات التي التصقت على سطح انبوب الاختبار الحاوي عليها لتقوم بالتثبيت والسحب صورة(6) مع حدوث تقلصات بالرؤيس الاولي من الناحية الجانبية صورة(٧) ومن ثم حركة طرفية ثم حركة خطم الطفيلي) صورة (8 ثم تحرر منطقة الخطاطيف مع بقاء محجمين الى الداخل) صورة (9 كما ظهرت الخطاطيف بشكلها الطبيعي (10) وبعد تحرر الخطم لوحظ كون طوق الاشواك غير دائرية (11) ومن ثم تحرر خطم الرؤيس الاولي وتكون رؤيس اولي بحجم عملاق بعد عشرة ايام وبعد مرور ١٤ يوم ينكمش الجزء السفلي من الرؤيس الاولي صورة (12)

صورة (5) توضح رؤيس اولي نحيف نامي وقد كون قطعة جسمية اولى سهم (857) مرة

صورة (6) توضح التصاق محجمين سهم من محاجم الطفيلي مع السحب (857) مرة

صورة (7) توضح التقلص الجانبي للرؤيس الاولي سهم مع بقاء ممصين غير متحررين

صورة (8) توضح حركة خطم الرؤيس الاولي والمنطقة الغير واضحة بسبب حركة الخطم سهم احمر مع تشبث الممصين الحران بسطح انبوب الاختبار سهم اسود (857) مرة



صورة (9) توضح تحرر منطقة الاشواك سهم اسود من الخطم ومحجمين سهم احمر وبقاء محجمين غير متحررين سهم اصفر (857)مرة

صورة (١٠) توضح خطاطيف الرؤيس الاولي (857) مرة

صورة (11) توضح تحرر المحاجم بواسطة تقلص عضلي من الناحية السفلية للرؤيس سهم اسود وبدت منطقة الكلاليب منبعجة غير دائرية سهم اصفر (857)مرة

صورة (12) توضح الرؤيس الاولي بعد التحرر الكامل للخطم وكان الرؤيس الاولي بحجم كبير بعد عشرة ايام (857) مرة

وسط مصل الدم والمحلول الفسلجي

ابدت الدراسة الحالية بقاء الطفيلي عند زرعة على وسط مكون من مصل دم الانسان والمحلول الفسلجي ان الطفيلي يبقى حي لمدة اسبوع وظهر الطفيلي نحيف من الناحية الخلفية صورة 13 بلغ معدل اطوال الطفيلي ١٧٤ مايكرون وعرضة ١٢٦ مايكرون كما بلغ معدل اقطار المحاجم ٣٣ مايكرون في حين بلغ قطر طوق الاشواك ٥٢ مايكرون

صورة (13) توضح رؤيس اولي تظهر فيه نحافة منطقته الخلف سهم اسود وفقدان الكلاليب سهم احمر كما تظهر المحاجم سهم اصفر (857) مرة

المناقشة

اثبتت الدراسة الحالية ان حضن الرويسات الاولية مع السائل العدري بدرجة حرارة 40 درجة مئوية تحفز انبعاج الرؤيسات الاولية للخارج وهذا جاء مخالف لما اشار اليه(Mohammadzadeh *et al.*(2012 ان عملية انبعاج الرؤيس الاولي للخارج تتطلب ٢٤ ساعة عند زرعها بوسط حاو على عصارة الصفراء للكلاب والذي اوعز هذا التغيير لوجود المادة الصفراء وقد يكون هذا منطقيا اذا ان حقن الرؤيسات الاولية بالتجويف الخلبي يؤدي الى تعلق الرؤيسات بواسطة ممصاتها وما يعنيه من وجوب حدوث عملية الانبعاج للخارج ويحث هذا الانبعاج بفعل حرارة الجسم.

ابدت طريقة التعقيم السطحي بمادة الكلور بتركيز ٣-٨% ومن ثم شطفها بالمحلول الفسلجي وسحب السائل العدري وأعادته اكثر من مرة كافية للحصول على مزرعة خالية من التلوث البكتيري والفطري على خلاف Smyth(1967) اذ استخدم Tetracyclin مع Nystatin لمنع نمو التلوث البكتيري والفطري في حين اضاف Macpheson and Smyth(1985) gentamicin الى المضادات الاخرى لمنع التلوث

استخدم Smyth (1990). بروتوكول الانزيمات pepsin و chymotrypsin و pencriatin في هضم مكونات الكيس المائي و الرؤيسات الميتة للحصول على الرؤيسات الحية فقط في حين استخدمت الدراسة الحالية طريقة الترسيب السريع في التخلص من الرؤيسات الميتة كون الميتة اخف وزنا .

اثبتت الدراسة الحالية ان وسط السائل العدري غير مناسب لزرع الطفيلي وقد يعود ذلك الى ان المحتوى الغذائي للسائل العدري غير كافي لأنماء الرؤيسات الاولية في المختبر او كون هذا الوسط يتطلب تجديد مستمر بسبب تراكم

المواد الاخراجية السامة وتجدد تزويدها بالمواد الغذائية من المضيف التي تصيبه اوقد يكون السائل العدري يلعب دور بالحفاظ على الطفيلي حي و لا تتوفر فيه متطلبات النمو والتطور .

ان سبب استمرار نمو الطفيلي حي في وسط البروتين كونه يحتوي على العديد من الاحماض الامينية الاساسية لنمو الطفيلي وهذا قد يتوافق مع ما توفره امعاء الكلاب من احماض امينية

بسبب تغذيتها بشكل رئيسي على اللحوم وهذا يعني وصول الاحماض الامينية للأمعاء اما سبب عدم استمرارها بالنمو لأكثر من 8 ايام فقد يكون بسبب نقص بعض عوامل البناء مثل الفيتامينات والاملاح المعدنية اما سبب عملقة الرؤيسات الاولية قد يكون بسبب فشل العضلات بإعادة التقلص بعد انبعاج الرؤيس الاولي الى الخارج اذ قد يكون مكانه قبل الانبعاج مليء بالسوائل بدلا عن التقلص والعودة الى شكلها الطبيعي او بسبب نقص بعض العوامل التي تساعد على تقلص الرؤيس وعودته الى الحالة الطبيعية.

بينت الدراسة الحالية ان وسط RPM مع البروتين هي افضل الاوساط المستخدمة في انماء الطفيلي اذ استمر نمو الطفيلي الى ١٤ يوم وقد يعود ذلك الى احتواء هذا الوسط على المكونات الاساسية لنمو الخلايا الحيوانية بالأوساط الزرعية وما يزيد كفاءة الوسط اضافة البروتين وقد يكون عمل هذا الوسط توافقي اذ يعمل الوسطان معا لتوفير المواد الغذائية الرئيسية لبقاء الطفيلي حي لهذه المدة وما يثبت ذلك ان الطفيلي لم يستمر بالبقاء لأكثر من ٦ ايام عند تنميتها على وسط RPM فقط .

استطاع الطفيلي البقاء حي في الوسط المكون من المحلول الفسلجي ومصل دم الانسان مما يدل على احتواء مصل دم الانسان العديد من عوامل البناء المفيدة لنمو وبقاء الطفيلي وهذا يتفق مع ما اشار اليه (٢٠١٢) Mohammadzadeh *etal* من عدم وجود فرق في نسب نمو الطفيلي عند استخدام مصل الكلاب او المصل البقري مع المصل البشري لفئة دم AB، لم يستطع Smyth(1974) تفسير دور الوعاء المستخدم بالزرع بنجاح وسرعة نمو الطفيلي وقد يكون حجم الوعاء مفيدا في الاسراع في نمو الطفيلي من خلال سهولة انتشار المواد الايضية فيها على العكس من الدراسة الحالية والتي استخدم فيها انابيب اختبار وهذا قد يكون اعاق حركتها بسبب تراكمها فوق بعضها بسبب ضيق المساحة ان تكون اول قطعة جسمية للطفيلي في وسط RPM والبروتين بعد ١٤ يوم جاء متفقا مع ان نمو الطفيلي وتكوينه اول قطعة جسمية يتطلب ١٤ يوم من اصابة المضيف النهائي.

Mohammadzadeh ،T؛ Sadjjadi ،S.M؛ Rahimi ،H.R.; Shams, S.(2012). Establishment of a Modified in Vitro Cultivation of Protoscoleces to Adult *Echinococcus granulosus*؛ an

Vol. 7, No.1, :Parasitol Iranian J .Hydatidosis Important Way for New Investigations on pp.59-66

Smyth, J.D. and Davies Z. (1974).In vitro culture of the strobilar stage of *Echinococcus granulosus* (sheep strain): A review of basic problems and results. Int J Parasitol. 4:631-44.

Smyth, J.D. (1967).Studies on tapeworm physiology. XI. In vitro cultivation of *Echinococcus granulosus* from the protoscolex to the strobilate stage. Parasitology. 57:111-33.

Smyth JD. (1990).Cestoda. In: Smyth JD, editor. In vitro Cultivation of Parasitic Helminthes. London: CRC press. p. 123-137.

Macpheson, C.N.L. and Smyth, J.D. (1985). In vitro culture of the strobilar stage of *Echinococcus granulosus* from protoscoleces of human, camel, cattle, sheep and goat origin from Kenya and buffalo origin from India. Int J Parasitol. 15(2):137-40.

Smyth, J.D. and Mc Manus, D.P. (1989). The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge University Press, Cambridge, England.

Elissondo, M.C; Pensel, P. and Denegri, M.G.(2017) Improvement of the *In Vitro* Culture of *Echinococcus Granulosus* Metacestodes J. of Microbiology & Exp. 4 (6)133

Deplazes, L.; Rinaldi, C.A.; Alvarez Rojas, P.R.; Torgerson ,M.F. ; Harandi, T.; Romig, D. ;Antolova, J.M.; Schurer, S.;Lahmar, G. ; Cringoli, J.; Magambo, R.C. and Thompson,

E.J.Jenkins (2017) Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis Adv. Parasitol., 95 pp. 315-493

Brunetti, E.; Kern, P. and Vuitton, D.A. (2010) .Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. Acta Trop.114:1-16.

A comparative study for production preservation media for protoscolex of *Echinococcus granulosus* in vitro .

Jafar H. M. *Muslim A. M. AL-Tooma **Karim H. T. Al-Daraoi

*muslimabdulrhmman@gmaial.com

** karimhalderawi59@gmail.com

Summery

A group of deferent media were tested during the present study to obtain a medium to preserve the vitality and activity of protoscolex of *Echinococcuse granulosus* and the use of media as a mean of biological and therapeutic test.

It was found that a 40C^{o} simulated the invagination of protoscolex in addition to stimulate the movement .Five media including RPM, hydrated fluid , RPM with protein , physiological solution with human serum ,and super amino protein , all enriched with the bile of dog.

It was found that the RPM and protein are the best media in maintaining the vitality of protoscolex for 14 day , followed by protein medium , blood serum and physiological solution in which the survival period reach more than 7 day while remained a live for three day in hydrated solution .