

امکان انتقال فاسیولا هیپاتیکا از طریق مصرف نمک سبز در مدل حیوانی

دکتر مهدی آسمار* - سید علی متولیان** - علیرضا مسیحا***

*استاد انگل شناسی و حشره شناسی پزشکی، انستیتو پاستور ایران

** مریی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران

*** مریی گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان

تاریخ دریافت مقاله: ۸۲/۱۲/۴

تاریخ پذیرش: ۸۳/۷/۱

چکیده

مقدمه: نمک سبز (دالار) یکی از انواع غذاهای سنتی مردم استان‌های شمالی (گیلان و مازندران) می باشد که از سبزیجات محلی منجمده از سبزیجاتی که در حاشیه و یا داخل آبها بویژه آب‌هایی که چرخه زیستی انگل فاسیولا در آنها برقرار است تهیه می‌شود و می‌تواند موجب سرایت فاسیولیاژیس به انسان شود. هدف: این مطالعه بمنظور تعیین امکان انتقال فاسیولا هیپاتیکا از طریق مصرف نمک سبز در مدل حیوانی انجام شد. مواد و روش‌ها: با تخصیص دو دستگاه آکواریوم و کشت سبزیجات محلی (خالواش و چوچاق) در آنها و انطباق شرایط آنها با شرایط طبیعی اعم از نور، حرارت و pH محیط را برای برقراری چرخه زندگی فاسیولا آماده کردیم. با آداپته کردن حلزون *Galba truncatula* در داخل آکواریوم‌ها و افزودن تخم‌های انگل فاسیولا هیپاتیکا در یکی از آکواریوم‌ها چرخه زندگی انگل برقرار گردید. از سبزیجات داخل آکواریوم‌ها اعم از آکواریوم آلوده و غیر آلوده به تفکیک نمک سبز (دالار) تهیه شد. نمک سبز آلوده و غیر آلوده به طور مجزا به دو گروه خرگوش به طور تغذیه اجباری خوراندند شد تا آلوده‌کنندگی نمک سبز آلوده مشخص شود همچنین از سبزیجات آلوده به متاسر کر فاسیولا با استفاده از فرمولاسیون مخصوص نمک سبز بهداشتی تهیه شد و به یک گروه خرگوش آزمایشگاهی به طریق تغذیه اجباری خوراندند شد تا با بررسی خرگوش‌ها، عدم آلوده‌کنندگی نمک سبز بهداشتی به اثبات برسد. خرگوش‌های تحت بررسی به روش‌های انگل‌شناسی مدفوع (روش کاتو و تلمن مدیفیه)، سرولوژی (C.C.I.E)، کالبد شکافی و جداسازی انگل بالغ از مجاری صفراوی مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج: گروه اول از خرگوش‌هایی که با نمک سبز آلوده تغذیه شده بودند در بررسی‌های انگل‌شناسی مدفوع، سرولوژی و کالبد شکافی تماماً به فاسیولا هیپاتیکا آلوده بودند در صورتیکه گروه شاهد تماماً منفی بودند. گروهی که با نمک سبز و سرکه نیز تغذیه شده بودند از نظر فاسیولا منفی بودند. گروه دوم از خرگوش‌هایی که با نمک سبز بهداشتی تغذیه شده بودند در بررسی‌های انگل‌شناسی، سرولوژی و کالبد شکافی از نظر آلودگی به فاسیولا تماماً منفی بودند. نتیجه‌گیری: نمک سبز (دالار) غیر بهداشتی و آلوده به متاسر کر فاسیولا می‌تواند موجب سرایت انگل به انسان شود که با تهیه نمک سبز بهداشتی همراه با سرکه می‌توان از سرایت بیماری فاسیولوز به انسان جلوگیری کرد.

کلید واژه ها: فاسیولا / فاسیولای کبدي / فنون و روش‌های آزمایشگاهی / نمک سبز

مقدمه

فاسیولیاژیس یکی از بیماری‌های انگلی مشترک بین حیوان و انسان (Zoonosis) است. عامل این بیماری ترماتودی از جنس فاسیولا (*Fasciola*) متعلق به خانواده فاسیولیده (*Fasciolidae*) است. مخزن انگل نشخوارکنندگان بویژه گوسفند و میزبان واسط آن حلزونی از جنس لیمنه (*Lymnea*) است. محل استقرار کرم بالغ در مجاری صفراوی و کیسه صفرای میزبان اصلی است (۲ و ۱۷).

که دامداری رایج است معمولا در بین دام‌ها شیوع دارد. میزان آلوده شدن انسان به این انگل کم و اغلب به صورت تک‌گیر است. گاهی این بیماری به شکل هم‌گیری ظاهر می‌شود و تاکنون ۳ همه‌گیری از آن گزارش شده است. اولین همه‌گیری در فرانسه با ۱۰۰ نفر مبتلا، در مصر با ۵۰۰ نفر و در ایران با بیش از ۱۰۰۰۰ نفر مبتلا بوده است (۱، ۲، ۳ و ۱۱).

این بیماری در اکثر مناطق دنیا به خصوص در کشورهای سیر تکاملی انگل در بدن حلزون میزبان واسط از مراحل

از آکواریوم‌ها افزوده شد تا چرخه زیستی انگل برقرار شود.

خروج میراسیدیوم‌ها از تخم انگل، آلوده‌شدن حلزون‌ها با میراسیدیوم، تشکیل مراحل اسپوروسیست و ردی در پیکره این حلزون‌ها، خروج سرکر از بدن آنها و تشکیل متاسرکر بر روی گیاهان داخل آکواریوم با میکروسکپ بررسی و پیگیری شد.

حال با خردکردن این گیاهان آلوده شده به متاسرکر در دستگاه خردکن «مولینکس» غلظت آن را با سرم فیزیولوژی به ۱۰ درصد رسانده و ۲۰ سی‌سی از سوسپانسیون مزبور با سرنگ سرکیج به دستگاه گوارش ۴ خرگوش آزمایشگاهی (در ۲ سری موازی)، ۵ سانتی‌متر مکعب به هر خرگوش خورانده شد. هم‌زمان از گیاهان داخل آکواریوم که آلوده به فاسیولا نبودند، مانند روش فوق سوسپانسیون گیاهی تهیه شد و به ۴ خرگوش دیگر آزمایشگاهی به عنوان گروه شاهد، به روش تغذیه اجباری (Force feeding) خورانده شد. در مرحله دوم نیز از گیاهان آلوده به متاسرکرهای موجود در آکواریوم اول همانند روش اول سوسپانسیون گیاهی تهیه شد و ۵۰ سانتی‌متر مکعب از آن با ۱۰۰ سانتی‌متر مکعب سرکه و ۱۵ گرم گلپر- نمک آمیخته و به این ترتیب نمک سبز (دالار) تهیه شد.

۲۰ سانتی‌متر مکعب از آن به ۴ خرگوش (در دو سری موازی) و به هر کدام ۵ سانتی‌متر مکعب با سرنگ سرکیج با همان روش تغذیه اجباری خورانده شد.

به مدت سه ماه هر ۱۵ روز یک‌بار سرم خون خرگوش‌ها با استفاده از آنتی ژن دفعی ترشچی تهیه شده از فاسیولا هپاتیکا به روش کانترکانت ایمونو الکتروفورز (C.C.I.E) مورد بررسی قرار گرفت تا در صورت یافتن پادتن اختصاصی ضد فاسیولا هپاتیکا، آلوده‌شدن آنها به عفونت فاسیولا تایید شود (۵، ۶، ۷، ۱۱، ۱۳، ۱۴ و ۱۵).

همچنین مدفوع خرگوش‌ها در طی این مدت با روش‌های انگل‌شناسی کاتو و تلمن اصلاح شده مورد آزمایش قرار گرفت (۱، ۲، ۳، ۹ و ۱۲). در پایان با کالبدشکافی

اسپوروسیست و ردی می‌گذرد و سپس به شکل سرکر از آن خارج شده و حال به گیاهان داخل یا حاشیه آب چسبیده و بر روی آنها به متاسرکر تبدیل می‌شود. انتقال بیماری از راه خوردن گیاهان آبی و نوشیدن آب آلوده به متاسرکر است (۲ و ۱۷).

ابتلای به این آلودگی انگلی باعث بروز علائم و عوارضی به نام فاسیولیاژیس (دستوماتوزیس) می‌شود که انسان از آن رنج می‌برد (۲، ۷، ۸، ۱۰ و ۱۸).

آشنایی با چرخه این بیماری در طبیعت و رعایت موازین بهداشتی مانع ابتلای انسان و بروز همه‌گیری می‌شود. بنابراین در این پژوهش بر آن شدیم تا با ایجاد چرخه زیستی فاسیولا هپاتیکا در آزمایشگاه، احتمال آلوده‌کنندگی نمک سبز (دالار) را مورد بررسی قرار دهیم. دالار یکی از مواد غذایی سنتی مردم گیلان و مازندران است و از سبزی‌های محلی منطقه تهیه می‌شود حال اگر نتیجه مثبت به دست آید می‌توان اقدام به تهیه نمک سبز بهداشتی کرد که به این ترتیب آلوده کننده نباشد.

این پژوهش در آزمایشگاه‌های میکروبی‌شناسی و جانورشناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان و با اعتبار پژوهشی این دانشگاه انجام شده است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از دو دستگاه آکواریوم به ابعاد ۷۷×۴۵×۳۰ سانتی‌متر استفاده شده است که در بستر آن خاک و ماسه شیب‌دار ریخته و با کاشتن گیاهان محلی شامل خالواش و چوچاق و سازگار کردن حلزون غالباً ترونکاتولا (*Galba truncatula*) شرایط برقراری چرخه زندگی فاسیولا هپاتیکا آماده گردید. انگل‌ها از کشتارگاه‌های قزوین و زیاران جمع‌آوری شد. برای این کار جگر گوسفندهای آلوده به انگل فاسیولا هپاتیکا از این کشتارگاه‌ها جمع‌آوری کرده و با جداکردن کرم‌های بالغ از مجرای صفراوی و له‌کردن آنها در سرم فیزیولوژی، تعداد قابل ملاحظه‌ای تخم انگل فراهم شد که پس از آماده‌سازی آنها در دمای ۲۲ درجه و تشکیل جنین به یکی

- در بررسی سرولوژی به روش C.C.I.E بر خون خرگوش در گروهی که با عصاره گیاه آلوده به متاسرکر تغذیه شده بودند، در ژل آگارز کمان رسوبی موید آلوده بودن حیوان به انگل دیده شد.

با این روش سرم خرگوش‌های گروه شاهد منفی و نیز خرگوش‌های تغذیه شده با نمک سبز (دالار) بهداشتی منفی بود (جدول و نمودار شماره ۱)

- در بررسی میکروسکوپی مدفوع خرگوش‌ها، گروهی که با عصاره گیاهی آلوده به متاسرکر تغذیه شده بودند ۲ ماه پس از آلوده‌سازی همه مثبت بودند و در زیر میکروسکپ تخم انگل دیده شد. (جدول و نمودار شماره ۱)

اما خرگوش‌های گروه شاهد منفی و گروهی که با نمک سبز بهداشتی تغذیه شده بودند کاملاً "منفی بودند. (جدول و نمودار شماره ۱)

- در کالبد شکافی خرگوش‌هایی که در آزمایش‌های سرولوژی و انگل‌شناسی مثبت بودند، کرم بالغ در مجاری صفراوی آنها دیده نشد. از کبد یک خرگوشی یک عدد و از کبد خرگوش دیگر ۳ کرم بالغ جدا شد. (جدول و نمودار شماره ۱).

- در این پژوهش روش‌های انگل‌شناسی (کاتو و تلمن اصلاح شده)، سرولوژی (C.C.I.E)، کالبد شکافی و جدا کردن کرم بالغ از مجاری صفراوی از لحاظ درجه حساسیت و ویژگی با یکدیگر تطبیق داشتند. (جدول شماره ۱)

خرگوش‌ها و دیدن کرم بالغ در داخل مجرای صفراوی و کیسه صفرا، آلودگی خرگوش‌های تغذیه شده با سوسپانسیون گیاهی آلوده به متاسرکر و آلوده‌نشدن خرگوش‌های شاهد منفی و خرگوش‌های تغذیه شده با نمک سبز بهداشتی تایید شد (۲، ۷، ۱۰ و ۱۶).

نتایج

در بررسی میکروسکوپی بخش‌های عمقی آکواریوم:

- تخم‌های فاسیولا هپاتیکا در شرایط آزمایشگاهی (دمای ۲۲ درجه سانتیگراد و دور از تابش نور) پس از ۳۵ روز رسیدند و در آنها جنین مژه دار (میراسیدیوم) تشکیل شد. با باز شدن دریچه تخم، میراسیدیوم‌ها خارج شدند و بعد از ۴۸ ساعت اکثر این تخم‌ها (۹۰٪) به میراسیدیوم تبدیل شدند.

- در بررسی میکروسکوپی آب در بخش عمیق آکواریوم تخم فاسیولا، پس از ۳۷ روز تعداد قابل توجهی میراسیدیوم دیده شد.

- در بررسی حلزون‌ها شش هفته پس از خروج میراسیدیوم‌ها از تخم و آلوده کردن حلزون‌ها با انگل فاسیولا، تشکیل اولین اسپوروسیست، و پس از هشت هفته تشکیل اولین ردی مورد تایید شد.

- یک ماه پس از دیدن اسپوروسیست در پیکره حلزون‌ها، خروج سرکرها تایید شد.

- در بررسی میکروسکوپی گیاه خالواش، آنکیسته شدن سرکرها (تشکیل متاسرکر) بر روی آن مشاهده شد.

جدول ۱: میزان آلوده کنندگی نمک سبز (دالار) از نظر فاسیولیاژیس بر حسب نوع غیر بهداشتی، بهداشتی و گروه شاهد به تفکیک روشهای

بررسی سه گانه در مدل حیوانی

روش		انگل شناسی مدفوع			سرولوژی			کالبد شکافی و جدا سازی انگل				
آزمایش	تعداد	منفی	مثبت	درصد	تعداد	منفی	مثبت	درصد	تعداد	منفی	مثبت	درصد
فراوانی گروه تحت بررسی	۴	۴	۰	۰	۴	۰	۰	۰	۴	۴	۰	۰
گروه شاهد	۴	۴	۰	۰	۴	۰	۰	۰	۴	۴	۰	۰
نمک سبز آلوده (غیر بهداشتی)	۴	۰	۴	۱۰۰	۴	۰	۴	۱۰۰	۴	۰	۴	۱۰۰
نمک سبز غیر آلوده (بهداشتی)	۴	۴	۰	۰	۴	۰	۰	۰	۴	۴	۰	۰
جمع	۱۲	۸	۴	۳۳	۱۲	۸	۴	۳۳	۱۲	۸	۴	۳۳

سرم فیزیولوژی این اتفاق افتاد. علت آنست که اگر تخم‌ها در بدن کرم بالغ رسیده باشند و کرم به اراده خود تخمگذاری کند، این‌گونه تخم‌ها با قرار گرفتن در آب در مدت یاد شده کاملاً می‌رسند به میراسیدیوم تبدیل می‌شوند. به نظر می‌رسد که با له کردن پیکره کرم‌ها و خارج کردن تخم‌ها فرصت کامل شدن تخم از بین رفته و آنها به طور نارس خارج شده باشند. به این ترتیب زمان بیشتری لازم خواهد بود تا در شرایط غیر طبیعی برسند و به میراسیدیوم تبدیل شوند. در نتیجه طول مدت از ۱۵-۹ روز به ۳۵ روز افزایش یافته است. همانند یافته‌های سایر محققان حلزون‌های *Galba runcatula* میزبان مناسب فاسیولا هیپاتیکا بودند (۲).

روش سرولوژی (C.C.I.E) و میکروسکپی مدفوع اصلاح شده تلمن به عنوان روش‌های مناسب برای تشخیص آلوده شدن خرگوش به فاسیولا هستند که با کالبد شکافی و جدا کردن کرم بالغ تایید شد.

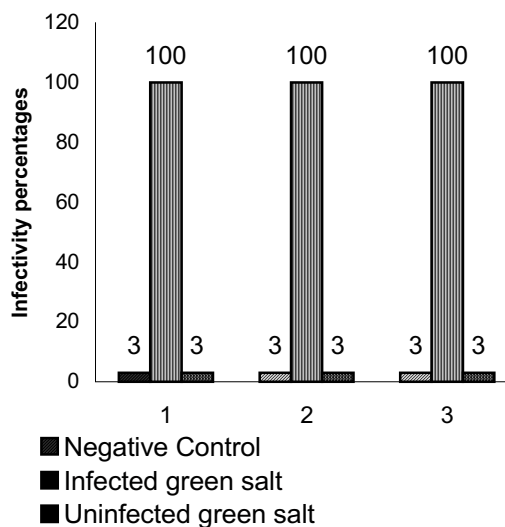
انتقال انگل فاسیولا به انسان معمولاً با خوردن سبزی‌ها بویژه سبزی‌های محلی آلوده به متاسرکر صورت می‌گیرد. اگر سبزی‌های مشکوک، به صورت خام خورده نشوند و از متاسرکرها زدوده شوند، خطر انتقال انگل مزبور به انسان منتفی خواهد شد.

حاصل این‌که، اگر از گیاهان آلوده یا مشکوک به آلودگی با متاسرکر فاسیولا روش مندرج در متدولوژی این پروژه، نمک سبز (دالار) تهیه شود، دیگر آلوده کننده نخواهد بود.

۳- امیدواری، ک: بررسی وفور فاسیولا هیپاتیکای انسانی در منطقه بندر انزلی، پایان‌نامه درجه چاپ شده دکترای علوم آزمایشگاهی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۷۱.

۴- پاکزاد، پ: اصول و تفسیر آزمایشهای سرولوژی بالینی تهران: انتشارات جهاد دانشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۱۳۶۹، صص ۴۱-۳۹.

در پایان می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از سرکه و گلپر نمک در تهیه نمک سبز (دالار) که طرز تهیه آن در متدولوژی این پروژه ذکر شده، موجب از بین رفتن متاسرکر فاسیولا هیپاتیکا می‌شود و از انتقال آن به انسان جلوگیری می‌کند



نمودار ۱: تاثیر نمک سبز در انتقال عفونت فاسیولیازیس

بحث و نتیجه‌گیری

در منابع مختلف ذکر می‌شود که تخم فاسیولا هیپاتیکا ۱۵-۹ روز پس از قرار گرفتن در آب رسیده به اصطلاح دریچه آن باز شده، میراسیدیوم از آن خارج می‌شود (۲) اما در این پژوهش ۳۵ روز پس از قرار گرفتن تخم در

منابع

- ۱- آسمار، م؛ فرقان پرست، ک؛ یادگاری، د؛ آزموده، م: بررسی فاسیولیازیس در استان گیلان (شهرستان بندر انزلی). مجله علمی انستیتو پاستور ایران، ۱۳۶۹، شماره ۵ و ۶، صص: ۶۳-۵۷.
- ۲- ارفع، ف: کرم شناسی پزشکی تهران؛ انتشارات دانش پژوه، ۱۳۶۹، صص ۲۳-۱۸.

Mdical Journal of the Islamic Republic of Iran 1991; 5(1,2): 23-27.

12. Brown HW, Neva F. Basic Clinical Parasitology. New York; Prentice Hall, 1983: 225-8, 303-11.

13. Hillyer GV. Immunodiagnosis of human Fasciolosis by Counter Electrophoresis. The Journal of Parasitology 1976; 62:(6): 1011-13.

14. Hillter GV, Dediiaz A. Use of Immunologic Technique to Detect Chemotherapeutic Success in Infections with Fasciola Hepatica I. Rabbit Infections. The Am J Trop Med Hyg 1976; 23(2).

15. Hillyer GV. Use of Counter Electrophoresis to Detect, Infection of Fasciola Hepatica. The Journal of Parasitology 1975; 63(3): 557-9.

16. Mereto M, Barron J. The Laparoscopic Diagnosis of the Liver Fascioliasis. Gastro Intestinal Endoscopy 1980; 26: 143-149.

17. Olsen OW. Animal Parasites: Their Life Cycles and Ecology. 3rd ed. Baltimore; University Park Press, 1974: 267-273.

18. Park C T, Ro J Y, Kim H, Gutierrez y. Human Ectopic Fascioliasis in the Cecum. American Journal of Surgical Pathology 1984; 8: 73-7.

۵- خرمی زاده ، م : آنتی ژنهای انگلی مجله گشتک؛ ۱۳۷۲، جلد اول شماره دوم ، صص ۳۴-۳۳.

۶- رضایی ، ح؛ اردهالی، ص؛ خوارزمی، الف؛ معتمدی، گ س: آشنایی با ایمنی شناسی. تهران؛ انتشارات مرکز دانشگاهی، ۱۳۶۳، صص ۴۵-۴۴.

7. Ferreira AW, et al. Fasciola Hepatica Human Infection Virchows Archiv, A Pathological Anatomy and histology 1970; 383:819-327.

8. Errasti C et al. Unusual Forms of Fasciola Hepatica Infestation. Medicina a Clinical (Barcelona) 1981; 76: 125-128.

9. Akahane H, Oshima T, et al. Diagnosis of Fascioliasis, A, Comparison of the Officacies of Various Concentration Techniques of Ova in Stool. Japanese Journal of Parasitology 1975; 24: 55-64.

10. Aliaga L, Diaz M, et al. Eosinophilic Pulmonary Disease Caused by Fasciola Hepatica. Medicina Clinic 1984; 82: 764-767.

11. Assmar M, et al. Sero Epidemiological Investigation of Fascioliasis in Northern Iran.

Potential Role of Green salt (Dalar) in Fascioliasis in Animal

Model

Assmar M. Ph.D, Motavallian SA.MS, Masiha AR. MS.

Abstract

Introduction: Green salt (known as Dalar by local people) is one of the favorable traditional flavors in Northern provinces of Gilan and Mazandaran. It is made of native plants (water grasses), which commonly grow at the edge or in water resources particularly the ones providing suitable conditions for Fasciola parasite. The consumption of green salt may cause Fascioliasis.

Objective: This Study was Conducted to determine the Possibility of Fasciola Transfer From Consumption of green Salt in animals.

Materials and Methods: The Fasciola life cycle was established in two aquariums by simulating field conditions such as light, pH and heat followed by growing in them two native water grasses known as Khalvash and Chochagh by local people. To do this the snail *Golba truncatula* was first adapted to aquariums conditions and then the *Fasciola hepatica* eggs were introduced to one of them. Green salts were prepared from plants grown in both *Metacecaria*-infested and *Metacercaria*-free aquariums and were force fed to two groups of rabbits. Besides, *Metacercaria*-infested green salt was treated with vinegar and was force-fed to another group of rabbits. A group was also left as control. The rabbit's feces were examined for *Fasciola* eggs with modified methods of Kato and Telman. The sera from all groups were checked by CCIE and the billiary ducts of rabbits were searched for adult worms.

Results: All the rabbits fed with plants grown in *Metacercaria*-infested aquarium turned positive by all the deployed methods including examination of feces for *Fasciola* eggs, CCIE and examination of billiary ducts for adult worms while the ones fed with plants grown in *Metacecaria*-free aquarium were negative. The group fed with vinegar-treated green salt was also negative.

Conclusion: The non-treated green salt contaminated with *Fasciola Metacecaria* can cause Fascioliasis, while treating it with vinegar can prevent the infection.

Key words: *Fasciola*/ *Fasciola Hepatica*/ Green Salt/ Laboratory Techniques and Procedures