Archive of SID

اثر بزاق زالو (Hirudo medicinalis) بر رشد دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکولای در شرایط آزمایشگاهی

مریم رسولی[۱و۲*]، حمید استاجی[۱]، مهران بیکها [۳]، سپیده مداح[۳]، بهناز رئیسیان[۱]، علیرضا مشتاقی [۳]، محمد روزبه [۳]

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
۲ -گروه پاتوبیولوژی، آموزشکده دامپزشکی شهمیرزاد، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
۳- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

***نشانی برای مکاتبه:** سمنان، جاده دامغان، پردیس شماره ۱ دانشگاه سمنان، دانشکده دامپزشکی

دریافت مقاله: آبان نود و هشت پذیرش برای چاپ: بهمن نود و هشت

چکیده

سابقه و هدف: با روند رو به افزایش مقاومت های باکتریایی، یافتن ترکیبات ضد میکروبی بیولوژیک بسیار ارزشمند است. نابراین در این مطالعه اثرات ضد میکروبی بزاق زالو بر روی رشد دوباکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (گرم مثبت) و *اشریشیا کولای* (گرم منفی) بررسی شده است.

روش کار: بدین منظور در شرایط آزمایشگاهی بزاق زالو استخراج گردید و در رقت های مختلف در میکروپلیت استریل به همراه محیط کشت BHI براث، و ۱×۱۰^{۸} باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشیریشیا کولای* کشت داده شد و نتایج پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت و تفسیر شد. تمام مراحل آزمایش ۲ هفته بعد مجددا تکرار شد

یافته ها : پس از ۲۴ ساعت *استافیلوکوکوس اورئوس* در تمامی گوده ها با کنترل مثبت اختلاف معنی دار مشاهده می شد که در مورد *اشریشیا کولای* تنها در گوده ۱ تا ۷ بود ($P<۰/۰۵$). پس از ۴۸ ساعت *استافیلوکوکوس اورئوس* در تمانی گوده ها مجددا با کنترل مثبت اختلاف معنی داری داشت که در مورد *اشریشیاکولای* تنها در گوده شماره ۱ (بیشترین غلظت بزاق زالو) تفاوت معنی داری در مهار رشد مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$).

نتیجه گیری: بزاق زالو دارای خواص ضد میکروبی می باشد و مطالعات بیشتر بر روی مدل های حیوانی ضروری به نظر می رسد.

واژگان کلیدی: بزاق زالو، زالو درمانی، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کولای

مقدمه

استافیلوکوکوس ها کوکسی های گرم مثبتی هستند که اندازه تقریبی آنها ۱ میکرومتر می باشد و در زیر میکروسکوپ به شکل خوشه های نامنظم دیده می شوند. گونه های مختلف آن همزیست پوست و غشاهای مخاطی هستند و برخی فرصت طلب و تولید عفونت های چرکی می کنند. اکثر استافیلوکوکوس ها بی هوازی اختیاری بوده و کاتالاز مثبت می باشند، غیر متحرک ، اکسیداز منفی و فاقد توانایی تولید اسپور هستند(۱، ۲). یکی از گونه های مهم پاتوژن، استافیلوکوکوس اورئوس (Staphylococcus aureus) می باشد. کوآگولاز مثبت بوده و نسبتا به شرایط محیطی پایدار می باشد. انتقال سویه های استافیلوکوکوس از حیوان به انسان محدود است ولی اهمیت دارد، به ویژه سویه های مقاوم به متی سیلین که انتقال آنها از حیوان به انسان و برعکس از اهمیت ویژه ای برخوردار است. استافیلوکوکوس اورئوس باعث سپتی سمی نوزادی و عفونت های زخم در اکثر گونه های جانوری می تواند باشد. سم آلفا (آلفا همولیزین) در ورم پستان های گانگرنی نشخوارکنندگان مهم ترین سم تولیدی توسط این باکتری می باشد. سم بتا (بتا همولیزین) که باعث آسیب غشاء سلولی می شود در جراحات پوستی انسان، سگ و خوک مهم می باشد. سموم روده‌ای مقاوم به حرارت آن در عفونت های غذایی انسان حائز اهمیت هستند. به دلیل اینکه استافیلوکوکوس ها همزیست پوست و غشاهای مخاطی هستند و در محیط نیز حضور دارند، منشا آلودگی می تواند داخلی یا خارجی باشد(۳).

www.SID.ir

Archive of SID

در خانواده انتروباکتریاسه آ (Enterobacteriaceae) باکتری های گرم منفی، میله ای و با اندازه حدود ۳ میکرو متر وجود دارند. گلوکز و طیف وسیعی از قندها را تخمیر کرده و اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت می باشند. بی هوازی اختیاری بوده و توانایی تولید اسپور ندارند. اشریشیا کولای (Escherichia coli) یکی از گونه های مهم این خانواده، تاژک دار و متحرک است و ورود این باکتری به لومن روده پستانداران کمی پس از تولد اتفاق می افتد و در تمام طول زندگی بخش مهمی از فلور طبیعی محسوب می شود. اکثر سویه های اشریشیا کولای همزیست و غیر حاد هستند ولی برخی فرصت طلب بوده و عفونت خارج روده ای همانند عفونت پستان نشخوارکنندگان و مجاری ادراری انسان و حیوانات ایجاد می کنند. سویه هایی نیز که باعث التهاب روده می شوند بخشی از فلور طبیعی نمی باشند و عمدتا عفونت با تماس مستقیم با حیوانات آلوده و یا آب یا غذای آلوده حاصل می شود. در حالت کلی سویه های اشریشیا کولای را به دو دسته کلی عامل بیماری روده ای و غیر روده ای تقسیم می کنند. در حال حاضر E.coli O157:H7 یکی از سروتیپ های خونریزی دهنده روده ناشی از غذا و ژئونوتیک می باشد. فاکتورهای حدت زا سویه های بیماریزا اشریشیا کولای شامل کپسول، اندوتوکسین، ساختارهای مسوول در اتصال و کلونی، انتروتوکسین ها و دیگر مواد ترشحی هستند(۳).

امروزه مقاومت دارویی یکی از مشکلات استفاده از آنتی بیوتیک ها می باشد که یافتن درمان های جایگزین و بیولوژیک می تواند بسیار راه گشا باشد. درمان با زالو یکی از قدیمی ترین روش های درمانی در پزشکی است. گونه های بسیاری از زالوها تاکنون شناسایی شده است که تنها ۱۵ گونه آن اهمیت پزشکی دارند و Hirudo medicinalis از سایر گونه ها در سراسر جهان بیشتر استفاده می شود. بزاق زالو طیف وسیعی از مواد با خاصیت دارویی مانند مواد ضد انعقاد و رقیق کننده خون، مواد ضد درد و ضد التهاب را دارا می باشد (۴). در سال ۱۹۵۰ پروتئینی با خاصیت مهار کنندگی ترومبین به نام هیرودین از زالو جدا گردید (۴، ۵) . علاوه بر بسیاری پروتئین های دیگر، دستبیلاز با فعالیت های گلیکوزیدازی اولین لیزوزیم بی مهرگان بود که دارای خاصیت ضد باکتریایی می باشد (۴، ۶).

هدف از این مطالعه تعیین اثر بزاق زالو بر رشد دو باکتری گرم مثبت و منفی و مقایسه آنها در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) بوده است تا بتوان برای آزمایش های بعدی در شرایط in vivo تصمیم گیری بهتری داشت.

روش کار

به منظور استخراج بزاق زالو پارافیلم اطراف سطح خارجی ارلن ۱۰۰ میلی لیتری متصل گردید. بین پارافیلم و لایه خارجی ارلن محلولی حاوی ۱ میلی مول آرژنین و ۰/۱۵ مول کلرید سدیم اضافه گردید.ارلن به سه پایه فلزی متصل شده و زالو روی پارافیلم چسبانده شد تا از محلول تغذیه کرده و خودبخود جدا شود. پس از جدا شدن از پارافیلم زالو داخل بشر و ۱۰ دقیقه در روی یخ قرار داده شد و سپس ظرف نزدیکی شعله قرار داده شد. با فعال شدن مجدد زالو مایعی غلیظ که همان بزاق زالو بود در بشر جمع آوری و به میکروتیوب منتقل گردید(۷). بزاق جمع آوری شده ۳ روز در فریزر قرار گرفت و سپس پروتئین تام آن با دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد.

دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کولای با رقت استاندارد ۰/۵ مک فارلند ($10^8 \times 1$ باکتری) آماده شد و به صورت زیر به گوده های میکروپلیت ۹۶ تایی استریل اضافه گردید:

در یک ردیف ۱۲ تایی به تمام گوده ها ۵۰ میکرولیتر محیط کشت استریل BHI براث اضافه شد. ۵۰ میکرولیتر بزاق زالو تنها به گوده اول اضافه شد و تا گوده ۱۲ رقیق شد (بدین صورت که ۵۰ میکرولیتر از گوده اول به گوده ۲ و ۵۰ مکرولیتر از گوده ۲ به ۳ منتقل می شد و این کار تا گوده ۱۲ ادامه پیدا کرد) در نهایت ۵۰ میکرولیتر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس یا اشریشیا کولای با رقت ۰/۵ مک فارلند به تمامی ۱۲ گوده اضافه شد. برای تکرار مشابه همین کار در یک ردیف دیگر ۱۲ تایی هم انجام گرفت.

برای کنترل منفی به ۴ گوده تنها ۵۰ میکرولیتر بزاق زالو و ۵۰ میکرولیتر محیط کشت BHI براث افزوده شد. برای کنترل مثبت استافیلوکوکوس اورئوس، به ۴ گوده ۵۰ میکرولیتر محیط کشت BHI براث و ۵۰ میکرولیتر غلظت ۰/۵ مک فارلند باکتری اضافه شد. برای کنترل مثبت اشریشیا کولای نیز همین باکتری بدین صورت در ۴ گوده کشت داده شد.

در زمان صفر، ۲۴ ساعت و ۴۸ پس از گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی گراد نتایج در طول موج ۴۹۰ و ۶۳۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفوتومتر قرائت و تفسیر شد. برای تکرار آزمایش کلیه مراحل دو هفته بعد از اولین آزمایش مجددا تکرار گردید. میانگین اعداد به دست آمده از کنترل مثبت، منفی و کشت های دو باکتری اشریشیا کولای و استافیلوکوکوس اورئوس تعیین شد. اعداد به دست آمده از کشت دو باکتری با آزمون تی با اعداد به دست آمده از کنترل منفی و مثبت در نرم افزار SPSS مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. $P<۰/۰۵$ به عنوان تفاوت معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

میزان پروتئین تام بزاق زالو به روش A280 در نانودراپ ۸۰۰ میکروگرم / میلی لیتر بود. با بررسی نتایج در دو طول موج ۴۹۰ و ۶۳۰ نانومتر تفاوت بارزی وجود نداشت بنابراین تفسیر نتایج تنها در طول موج ۴۹۰ نانومتر انجام گردید (جدول ۱ و ۲).

در تست استافیلوکوکوس اورئوس (۲ ردیف ۱۲ تایی، ۲ تکرار) پس از ۲۴ ساعت: از اعداد به دست آمده از دو ردیف کشت میانگین گرفته شد. در گوده ۱ که بیشترین غلظت بزاق وجود داشت کمترین میزان رشد باکتری دیده شد و بسیار به کنترل منفی

www.SID.ir

Archive of SID

نزدیک بود. از گوده ۲ تا ۱۲ با کاهش غلظت بزاق زالو بر رشد باکتری با شیب ملایمی افزوده می شد و تقریبا در گوده های ۹-۶ نتایج مشابه و ثبات رشد دیده می شد ولی در گوده ۱۲ (کمترین غلظت بزاق زالو) میزان رشد باز هم به میانگین کنترل مثبت استافیلوکوکوس نرسید (جدول ۱). پس از ۴۸ ساعت از گرمخانه گذاری مجددا گوده ۱ با بیشترین غلظت بزاق زالو کمترین رشد باکتری را داشت که به تدریج این میزان رشد افزایش نشان می داد (جدول ۲).

در تست اشریشیا کولای (۲ ردیف ۱۲ تایی، ۲ تکرار) پس از ۲۴ ساعت: مجددا از اعداد بدست آمده از دو ردیف کشت میانگین گرفته شد و با کنترل منفی و مثبت مقایسه شد: در گوده ۱ که بیشترین غلظت بزاق زالو وجود داشت مجددا کمترین رشد باکتری و نزدیک به کنترل منفی مشاهده گردید. بین گوده ۲ و ۳ جهش رشد باکتری دیده شد و پس از آن رشد باکتری با کاهش غلظت بزاق زالو افزایش می یافت. در گوده های ۶-۴ ثبات نسبی رشد دیده شد (جدول ۱). پس از ۴۸ ساعت از گرمخانه گذاری بعد از گوده ۱ (بیشترین غلظت بزاق زالو) جهشی در رشد باکتری دیده شد و در گوده ۹-۲ ثبات نسبی رشد مشاهده گردید (جدول ۲).

در آنالیز آماری تست استافیلوکوکوس اورئوس (۲ ردیف ۱۲ تایی، ۲ تکرار) پس از ۲۴ ساعت: همه گوده ها با کنترل منفی اختلاف معنی داری داشتند ($P<۰/۰۵$)، این بدین معناست که رشد باکتری به صورت معنی دار با کنترل منفی در همه گوده ها اتفاق افتاده است. تمامی گوده ها نیز دارای اختلاف معنی دار با کنترل مثبت بودند ($P<۰/۰۵$) و بدین معناست که باکتری رشد داشته است ولی به صورت معنی داری در تمامی غلظت های بزاق زالو مهار رشد به وجود آمده است (جدول ۱). پس از ۴۸ ساعت از گرمخانه گذاری مجددا همه گوده ها با کنترل منفی و مثبت اختلاف معنی داری داشتند ($P<۰/۰۵$) (جدول ۲).

درآنالیز آماری تست اشریشیا کولای (۲ ردیف ۱۲ تایی، ۲ تکرار) پس از ۲۴ ساعت: تنها گوده ۱ با کنترل منفی معنی دار نبود ($P>۰/۰۵$)، این بدین معنی است که مهار رشد توسط بزاق زالو در گوده ۱ که بیشترین غلظت بزاق وجود داشته به خوبی روی داده است به طوریکه اختلاف معنی داری با کنترل منفی مشاهده نمی شود. با مقایسه ۱۲ گوده با کنترل مثبت تنها در گوده های ۱ تا ۷ اختلاف معنی دار دیده می شد ($P<۰/۰۵$) که بدین صورت قابل تفسیر است که با کاهش غلظت بزاق مهار رشد نیز کاهش می یافت (جدول ۱).

پس از ۴۸ ساعت از گرمخانه گذاری تمامی گوده ها با کنترل منفی اختلاف معنی دار داشتند ($P<۰/۰۵$)، و فقط گوده شماره ۱ (بیشترین غلظت بزاق) با کنترل مثبت اختلاف معنی دار داشت که بدین صورت می توان تفسیر کرد که پس از ۴۸ ساعت رشد باکتری اشریشیا کولای فقط در بیشترین غلظت بزاق به خوبی مهار شده بود (جدول ۲).

جدول ۱. میانگین اعداد گوده های مختلف کشت در ۱۲ غلظت، کنترل منفی (-C) و کنترل مثبت (+C) (بعد از ۲۴ ساعت)

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	C-	C+
اشریشیا کولای	۰/۲۲۸	۱/۴۷	۱/۴۸	۱/۴۸	۱/۴۷	۱/۴۶	۱/۵۰	۱/۴۷	۱/۴۵	۱/۵۴	۱/۵۵	۱/۵۷	۰/۱۰۰۷	۱/۴۵۱
استافیلوکوکوس اورئوس	۰/۲۷۳	۰/۹۸۹	۱/۰۹۶	۱/۱۷۶	۱/۴۸۹	۱/۳۸۱	۱/۳۸۸	۱/۳۵۸	۱/۳۶	۱/۳۷	۱/۵۵۷	۱/۶۳۸	۰/۱۰۰۷	۱/۴۳۸

جدول ۲. میانگین اعداد گوده های مختلف کشت در ۱۲ غلظت، کنترل منفی (-C) و کنترل مثبت (+C) (بعد از ۴۸ ساعت)

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	
اشریشیا	۰/۲۲۸	۱/۴۷	۱/۴۸	۱/۴۸	۱/۴۷	۱/۴۶	۱/۵۰	۱/۴۷	۱/۴۵	۱/۵۴	۱/۵۵	۱/۵۷	۰/۱۰۰
استافیلو اورئوس	۰/۲۷۳	۰/۹۸۹	۱/۰۹۶	۱/۱۷۶	۱/۴۸۹	۱/۳۸۱	۱/۳۸۸	۱/۳۵۸	۱/۳۶	۱/۳۷	۱/۵۵۷	۱/۶۳۸	۰/۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

مکانیسم های مختلف مواد تشکیل دهنده بزاق زالو به چند دسته کلی تقسیم می شوند؛ پس از گزش باید تخریب ماتریکس خارج سلولی انجام شود، مهار چسبندگی، تجمع و انعقاد و افزایش جریان خون به خونخواری بهتر کمک می کند، زالو با فعالیت ضدمیکروبی بزاق باعث محافظت از خود در مقابل اجرام مختلف می شود و با اثرات ضددرد و ضدالتهابی از شناسایی شدن توسط میزبان جلوگیری به عمل می آید (۸).

برخی پروتئین های بزاق که دارای خاصیت ضد میکروبی هستند شناسایی شده اند که می توان به دستبیلاز، کلرمیستین، تروماسین، ترومایزین و پپتید بتا اشاره کرد (۸) و همانطور که گفته شد دستبیلاز فعالیت بتا گلیکوزیداز داشته و به طور مستقیم پیوندهای ۱β -۴ که در لایه پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری‌ها اهمیت دارد را، می‌شکند (۹). این عمل شبیه به عمل لیزوزیمی (مورآمیداز) است که به طور معمول در بزاق و اشک انسان یافت می‌شود (۸). مطالعات دیگر نشان داده‌اند که فعالیت ضدمیکروبی تنها به فعالیت آنزیمی گلیکوزیداز وابسته نیست و به عوامل غیرآنزیمی نیز مرتبط است (۶). حتی اشکال دناتوره دستبیلاز اثر باکتریواستات وابسته به دوز را علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیا کولای* نشان داده است (۱۰). کلرمیستین یک آنتی‌بیوتیک قوی موجود در ترشحات زالو می‌باشد. اما متاسفانه اطلاعات درمورد این مولکول محدود است(۱۱).

در دهه اخیر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها به عنوان یک مشکل بزرگ در سلامت عمومی مطرح است. به دلیل استفاده نادرست و بی رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در پزشکی و دامپزشکی، ورود بقایای آنتی بیوتیکی به موادغذایی و آب، عدم تکمیل دوره درمان و عدم رعایت نکات صحیح بهداشتی و پیشگیری از بیماری ها باعث افزایش تعداد باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها می شود و متاسفانه گاهی انتقال مقاومت به سایر میکرو ارگانیسم‌های بیماری-زا نیز صورت می گیرد (۳).

در یک مطالعه ***in vitro*** در مالزی که اثرات ضد میکروبی بزاق زالو بر روی ***Bacillus cerues***، ***S.aureus*** (باکتری های گرم مثبت)، ***Pseudomonas aeruginosa***، ***E.coli*** و ***Salmonella typhi*** (باکتری های گرم منفی) به روش قراردادن دیسک های آنتی بیوگرام و حداقل غلظت مهار رشد با تهیه رقت بررسی شدند. در تست آنتی بیوگرام مهار رشد به

وسیله بزاق استخراج شده در مورد ***S.typhi*** و ***E.coli*** مشاهده شد که محدوده مهاری کوچک تر از دیسک های آنتی بیوتیک های شیمیایی مانند سیپروفلوکساسین بود و در روش تهیه رقت مهار رشد باکتری، در مورد ***S.aureus*** و ***E.coli*** مهار رشد باکتری به وسیله بزاق زالو دیده شد (۷) که مشابه نتایج این تحقیق بود. در آن مطالعه غلظت پروتئین های بزاق زالو استخراجی ۸۰ میکروگرم/ میلی لیتر بود (۷) که در مطالعه حاضر ۸۰۰ میکروگرم / میلی لیتر بوده است. این تفاوت می تواند به دلیل شیوه استریل سازی بزاق استخراج شده باشد. در آن مطالعه بزاق استخراج شده فیلتر گردیده بود (۷) که در این مطالعه پس از فیلتر کردن بزاق زالو و سنجش میزان پروتئین های آن، میزان پروتئین ها به صفر رسیده بود، بنابراین از ۳ روز فریز کردن بزاق زالو در ۲۰- درجه سانتی گراد استفاده شد و همانطور که ذکر شد بدون کاهش غلظت پروتئین های استخراجی در محیط کشت BHI براث نیز باکتری رشد نکرد.

در این مطالعه با مقایسه نتایج رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (گرم +) و *اشریشیا کولای* (گرم-) در هر دو قرائت ۲۴ ساعت بعد از گرمخانه گذاری، در مورد *اشریشیاکولای* با کاهش غلظت بزاق از گوده ۷ اختلاف معنی داری با کنترل مثبت مشاهده نگردید ولی در *استافیلوکوکوس* نحوه افزایش رشد در تمامی غلظت های بزاق زالو به صورت معنی داری مهار شده بود. با مقایسه نتایج ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از گرمخانه گذاری اثر بزاق زالو پس از ۴۸ ساعت تقریبا بعد از بیشترین غلظت تغییر معنی داری بر رشد باکتری *اشریشیاکولای* وجود نداشت ولی در *استافیلوکوکوس اورئوس* مهار رشد در همه غلظت های بزاق زالو معنی دار بود. بر اساس نتایج مشخص گردید که تغییر رشد باکتری گرم منفی *اشریشیاکولای* نسبت به گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر وابسته به تغییر غلظت بزاق زالو بود.

تحقیق حاضر مقدمه ای برای بررسی اثرات ضدمیکروبی بزاق زالو در شرایط آزمایشگاهی بود که نتایج مطلوبی نیز به همراه داشت ولی ضروری به نظر می رسد که به منظور ادامه تحقیق، تزریق بزاق زالو استریل و نیز زالو درمانی بر روی مدل های حیوانی به منظور بررسی بیشتر اثرات ضدمیکروبی این فرآورده بیولوژیک صورت پذیرد. برای مثال در یک مطالعه بالینی اثر زالودرمانی بر روی ۵۱ بیمار سرپایی مبتلا به استئوآرتریت زانو انجام پذیرفت. در همان روزهای ابتدایی عمده درد بالینی، بعد از زالودرمانی استئوآرتریت زانو، تسکین یافت (۱۲).

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES

1. Abbot Y, Leggett B, Leonard FC, Rossney AS, Markey BK. Isolation rates of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs, cats and horses in Ireland. Vet Rec. 2011; 166: 451–5.
2. O'Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Clin Microbiol Rew. 2004; 17: 218-34.
3. Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Fitzpatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. Veterinary microbiology and microbial disease, 2nd ed. London: Wiley-Blackwell; 2011.
4. Michalsen A, Roth M, Dobos G. Medical leech therapy. Germany; Georg Thieme Verlag; 2007.
5. Electricwala A, Sawyer RT, Jones CP, Atkinson T. Isolation of thrombin inhibitor from the leech *Hirudinaria manillensis*. Blood Coagul & Fibrinolysis. 1991; 2: 83-9.
6. Zavalova LL, Yudina, TG, Artamonova II, Baskova IP. Antibacterial non-glycosidase activity of invertebrate destabilase-lysozyme and of its helical amphipathic peptides. Chemotherapy. 2006; 52: 158-60.
7. Abdualkader AM, Merzouk A, Ghawi AM, Alaama M. Some biological activities of Malaysian leech saliva extract. IIUM Eng J. 2011: 12: 525-35.
8. Sig AK, Guney M, Guclu AU, Ozmen E. Medical leech therapy—an overall perspective. Integr Med Res. 2017; 6: 337-43.
9. Zaidi SM, Jameel SS, Zaman F, Jilani S, Sultana A, Khan SA. A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches. Altern Med Rev. 2011; 16: 59-65.
10. Indergand S, Graf J. Ingested Blood Contributes to the Specificity of the Symbiosis of *Aeromonas veronii Biovar Sobria* and *Hirudo medicinalis*, the Medicinal Leech. Appl Environ Microbiol. 2000; 66: 4735-41.
11. Abdullah S, Dar LM, Rashid A, Tewari A. Hirudotherapy/leech therapy: applications and indications in surgery. Arch Clin Exp Surg. 2012; 1: 172-80.
12. Michalsen A, Klotz S, Ldtke R, Moebus S, Spahn G, Dobos G J. Effectiveness of leech therapy in osteoarthritis of the knee: a randomized, controlled trial. Ann Intern Med. 2003; 139: 724-30.

www.SID.ir